

Die Transplantation von Eizellen

I. Der heutige Stand der Eizellübertragung

II. Eigene Versuche
mit Eizellen vom Rind und Kaninchen

Max Berchtold

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Baier

DIE TRANSPLANTATION VON EIZELLEN

- I. Der heutige Stand der Eizellübertragung
- II. Eigene Versuche mit Eizellen vom Rind und Kaninchen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Max Berchtold, Tierarzt
aus Uster/Schweiz

1959



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf

Referent: Professor Dr. W. Baier

Tag der Promotion: 25. 7. 1958

UNI - Druck, München 13, Amalienstraße 85

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

DER HEUTIGE STAND DER EIZELLÜBERTRAGUNG

	Seite
I. Wesen, Bedeutung und Probleme der Eizellübertragung	
A. Allgemeines	1
B. Die Bedeutung der Eizellübertragung	1
C. Probleme	2
D. Historisches	3
E. Das Kaninchen als Versuchsobjekt	3
II. Ovulation und Superovulation	
A. Die Bedeutung der kontrollierbaren Ovulation	4
B. Die Möglichkeiten zur Beeinflussung der Ovulation	4
C. Ovulation und Superovulation beim Kaninchen	5
D. Superovulation bei Maus und Ratte	12
E. Ovulation und Superovulation beim Rind	13
F. Ovulation und Superovulation beim Schaf	22
G. Ovulation und Superovulation bei der Ziege	24
H. Diskussion	25
III. Die Befruchtung	
A. Lebensdauer und Befruchtungsfähigkeit der Eizelle	26
B. Morphologische Veränderungen der Oozyten	28
C. Kriterien der befruchteten Eizelle	30
D. Die künstliche Befruchtung	31
IV. Die Gewinnung von Eizellen	
A. Die Eizellgewinnung beim Kaninchen	33
B. Die Eizellgewinnung beim Rind	37
C. Die Eizellgewinnung beim Schaf	39
D. Die Eizellgewinnung bei Maus und Ratte	39
E. Diskussion	40
V. Aufbewahrung und Kultur von Eizellen	
A. Faktoren, welche die Vitalität kultivierter Eizellen beeinflussen	40
B. Die Kultur von Eizellen in vivo	46

	Seite
VI. Die Eizellübertragung im engeren Sinn (Inovulation)	
A. Die Gleichschaltung des Geschlechtszyklus	47
B. Die Technik der Eizellübertragung (Inovulation)	51
C. Die Transplantation zwischen verschiedenen Tierarten	54
D. Faktoren, welche die Entwicklung transplanterter Eizellen beeinflussen	55

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Die Eigewinnung am toten Tier	
A. Die Isolierung von Eizellen aus Schlachthofmaterial	59
B. Die Untersuchung der Spülflüssigkeit	61
C. Diskussion	62
II. Untersuchungen zum Nachweis der Vitalität von Eizellen	
A. Mikroskopische Untersuchung	63
B. Veränderungen der Eizellen nach verschiedenen Temperatureinflüssen	64
C. Befruchtungsversuche	66
III. Mehrzellige Oozyten	67
IV. Diskussion	68
V. Versuche mit Kaninchen	69
Zusammenfassung	71
Literaturnachweis	73

ERSTER TEIL

DER HEUTIGE STAND DER EIZELLÜBERTRAGUNG

I. WESEN, BEDEUTUNG UND PROBLEME DER EIZELLÜBERTRAGUNG

A. Allgemeines

Eitransplantation bedeutet: Gewinnung von Eizellen eines Spendertieres und anschließende Übertragung auf ein Empfängertier.

Es liegt auf der Hand, daß die Übertragung einer Eizelle ein außerordentlich vielschichtiger Vorgang ist. Das komplexe Geschehen streift die verschiedensten wissenschaftlichen Disziplinen (Genetik, Embryologie, Anatomie, Physiologie, Chirurgie, Endokrinologie usw.). Es würde weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, auf alle diese Spezialgebiete näher einzutreten, als es für das Verständnis der Zusammenhänge gerade notwendig ist. Sinn und Zweck dieser Arbeit ist es, die zu diesem Problem veröffentlichte Literatur zu sammeln, zu sichten und zu ordnen. Die bisherigen Versuche sollen zusammengestellt, die Ergebnisse diskutiert und einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Eigene Untersuchungen befassen sich mit der Überprüfung der Möglichkeit, ob sich Eizellen, die am Schlachthof aus Geschlechtsorganen frisch getöteter Tiere gewonnen wurden, zum Studium der mit der Eizelltransplantation in Zusammenhang stehenden Probleme eignen. Ferner sollten in Experimenten mit Kaninchen Erfahrungen gesammelt werden über die technische Durchführung der Eizellübertragung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich zur Hauptsache mit Untersuchungen an Kaninchen, dem für diese Zwecke besonders geeigneten Versuchstier, sowie Rindern und Schafen, für welche eingehende Kenntnisse über die Eitransplantation aus medizinischen, züchterischen und wirtschaftlichen Gründen besonders erwünscht sind. Eine entsprechende Literaturangabe ermöglicht es dem interessierten Leser, sich mit Einzelheiten zu diesen, in deutschsprachigen Gebieten noch recht wenig erforschten Problemen vertraut zu machen.

B. Die Bedeutung der Eizellübertragung

Die Übertragung von Eizellen ist nicht nur theoretisch sondern auch praktisch und wirtschaftlich von großer Bedeutung. Sie eröffnet der Tierzucht nie geahnte Perspektiven, weist der wissenschaftlichen Forschung neue Wege und ermög-

licht den verschiedensten Disziplinen der Biologie und der Medizin grundlegende Untersuchungen. In all ihren Konsequenzen ist die Eitransplantation gegenwärtig noch gar nicht erfaßbar. Aus der Fülle der Möglichkeiten seien die wichtigsten stichwortartig aufgezählt:

- Studium der Physiologie und Entwicklung der Säuger-Eizelle.
- Bestimmung des Einflusses der mütterlichen, uterinen Umgebung auf die prä- und postnatale Entwicklung des Föten (165).
- Untersuchungen über Probleme der Genetik und Züchtung.
- Rascheres Erreichen von homologem Zuchtmaterial.
- Verkürzung der Generationsfolge und dadurch frühere Nachzuchtprüfungen.
- Abklärung von Sterilitätsursachen durch reziproke Transplantationen.
- Untersuchungen zum Problem der embryonalen Mortalität. (Genetische Konstitution des Eies oder uterine Umgebung als Ursache der Frühsterblichkeit.

C. Probleme

Damit die Eitransplantation eine praktische Bedeutung erlangen kann, müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Einfachheit des technischen Vorgehens.
2. Sicherheit des Erfolges.
3. Wirtschaftlichkeit.

Diese Forderungen können nur erfüllt werden, wenn zuvor grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden über:

- Auslösung multipler Ovulationen (Superovulation) .
- Befruchtung in vivo und in vitro .
- Gewinnung befruchteter und unbefruchteter Eizellen.
- Entwicklung eines geeigneten Mediums zur Gewinnung, Aufbewahrung und Übertragung von Eizellen.
- Aufbewahrung und Kultur von Eizellen in vivo und in vitro.
- Gleichschaltung des Geschlechtszyklus von Spender- und Empfängertier.
- Technik der Eiübertragung (Inovulation).

D. Historisches

Im Jahre 1890 zeigte Heape (110) als erster, daß es möglich ist, eine befruchtete Eizelle von einem Kaninchen auf ein anderes zu übertragen und zur Weiterentwicklung zu bringen. Die Veröffentlichung dieses bedeutungsvollen Resultates blieb jedoch ohne Widerhall und fiel während mehr als dreier Jahrzehnte der Vergessenheit anheim. Das Interesse der Wissenschaft wandte sich der Erforschung der männlichen Geschlechtszellen zu. Auf breiter Basis wurden Untersuchungen angestellt über Gewinnung, Behandlung und Weiterverbreitung des männlichen Samens. Erst als die künstliche Besamung begann, zur Routinearbeit zu werden, wurden die Versuche mit weiblichen Geschlechtszellen wieder aufgenommen.

1922 verifizierten Biedl u. a. (24) die Ergebnisse von Heape. 1930-1940 stellten Pincus u. Mitarb. ausgedehnte Untersuchungen an über weibliche Keimzellen, die Möglichkeiten ihrer Gewinnung, Aktivierung, Befruchtung und Übertragung (147, 148, 149, 150, 153, 154, 155).

Die ersten Untersuchungen wurden vorwiegend mit Kaninchen durchgeführt. Später dehnten sich die Experimente auch auf andere Tiere aus.

Ratten: Nicholas (139, 140), Simpson u. a. (169).

Mäuse: Beatty u. a. (22, 23), Hammond (104).

Schaf und Ziege: Warwick u. a. (182, 184).

Schwein: Kvasnicki (117).

Nachdem der Beweis erbracht worden ist, daß Eizellen erfolgreich übertragen werden können, ist es Aufgabe der Wissenschaft, auf breiter Basis einschlägige Grundlagenforschung zu betreiben. War vor 10 Jahren der Prozentsatz positiver Transplantationen noch so niedrig, daß wenig Hoffnung bestand auf eine erfolgreiche Weiterentwicklung dieser Methoden, so stiegen die Aussichten hierfür nach den Untersuchungen von Chang in den USA, Venge in Schweden und Dowling in England. Die genaue Kenntnis aller bei einer Transplantation beteiligten Faktoren ist die Voraussetzung für eine wissenschaftlich und wirtschaftlich bedeutungsvolle, d. h. in großem Ausmaß durchführbare Eiübertragung.

E. Das Kaninchen als Versuchsobjekt

Das Kaninchen hat sich als geeignetes Versuchstier erwiesen für alle Untersuchungen, die mit der Erforschung der Grundlagen zur Eiübertragung in Verbindung stehen. Abgesehen von wirtschaftlichen Überlegungen sind es folgende

Eigenschaften, die das Kaninchen zu Übertragungsversuchen prädestinieren: Kurze Trächtigkeitsdauer - große Wurfzahl - leichte Beeinflußbarkeit der Ovulation in zeitlicher und quantitativer Hinsicht - leichte operative Zugänglichkeit des Geschlechtsapparates - mit einer Albuminschicht versehene Eizellen, welche einen gewissen Schutz gewährt gegen äußere Einflüsse.

Auf eine Gefahr sei jedoch nachdrücklich hingewiesen: Die am Kaninchen gewonnenen Erfahrungen und Ergebnisse dürfen nicht ohne Vorbehalt auf andere Tiere übertragen werden. Es muß erst noch erforscht werden, wie weit die Eizellen einzelner Tierarten physiologische Verschiedenheiten aufweisen.

II. OVULATION UND SUPEROVULATION

A. Die Bedeutung der kontrollierbaren Ovulation

Das Freiwerden von Eizellen aus den reifen Graafschen Follikeln der Ovarien wird als Ovulation bezeichnet. Auf den Mechanismus dieses Vorganges soll hier nicht näher eingetreten werden. In erster Linie interessieren folgende Fragen:

1. Kann der Ovulationstermin zeitlich beeinflusst werden, und zwar sowohl bezüglich des ersten Vorkommens beim juvenilen Tier als auch innerhalb des Brunstzyklus beim geschlechtsreifen Individuum?
2. Können Eireifung und Ovulation quantitativ und qualitativ beeinflusst werden; d. h. gibt es Mittel und Wege, um zum gleichen Zeitpunkt eine überdurchschnittliche Zahl reifer, befruchtungs- und entwicklungsfähiger Eizellen zur Ovulation zu bringen? (Superovulation)

Eine befriedigende Lösung dieser Probleme ist eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Eiübertragung. Nur durch die Verwendung von Eizellen juveniler Tiere kann die Generationsfolge verkürzt, können Nachzuchtprüfungen früher angesetzt werden. Erst durch die Superovulation wird es möglich, weibliches Keimmateriel in vermehrtem und vor allem wirtschaftlich interessantem Ausmaß zur Leistungszucht auszunützen.

B. Die Möglichkeiten zur Beeinflussung der Ovulation

Wie können wir die Ovulation auslösen oder beeinflussen? Die Beantwortung dieser Frage richtet sich nach den tierartlichen Besonderheiten. Die prinzipiell möglichen Wege seien kurz skizziert:

1. Spontane Ovulation: Sie bildet bei den meisten Tieren im natürlichen Ab-

lauf des Geschlechtszyklus die Regel.

2. Kopulation: Provoziert beim Kaninchen durch neurogene Stimulation der Hypophyse die Ovulation.
3. Behandlung mit Schwermetallsalzen: Positive Ergebnisse liegen nur beim Kaninchen vor.
4. Behandlung mit Atropin: Vermag beim Rinde die Ovulation während längerer Zeit zu unterdrücken.
5. Hormone: Sie stellen bei unseren Haustieren, abgesehen von der manuellen Entfernung des Gelbkörpers beim Rind, die einzige Möglichkeit dar, den normalen Ablauf des Geschlechtszyklus entscheidend zu modifizieren. Durch die Injektion von Hormonen können wir die Ovulation zeitlich und quantitativ willkürlich festlegen.

C. Ovulation und Superovulation beim Kaninchen

1. Die Bedeutung der Kopulation

Das Kaninchen weist als sexualphysiologische Besonderheit eine provozierte Ovulation auf. Ungefähr zehn Stunden nach der Kopulation vollzieht sich mit großer Regelmäßigkeit der Follikelsprung. Die durchschnittliche Zahl der zur Ovulation gelangenden Follikel beträgt 6 - 15.

2. Die Wirkung der Schwermetallsalze

Es hat sich gezeigt, daß durch die Zufügung von sog. "inert substances" die Wirkung von verschiedenen gonadotropen Hormonen, meist hypophysären Ursprungs, verstärkt werden kann (75). Es scheint, daß diese Substanzen eine selektive Wirkung ausüben auf den Hypophysenvorderlappen, welche zur Produktion oder Ausschüttung von Gonadotropinen führt.

Emmens (84) prüfte verschiedene Salze auf ihre Wirksamkeit und fand folgende Resultate:

- a. 15 mg Cu-Azetat lösten bei 11 von 15 Kaninchen (= 85 %) die Ovulation aus. Zwei Tiere starben kurz nach der Injektion. Die Ovulation schien in jeder Beziehung normal und trat innerhalb 24 Std. post injectionem auf.
- b. Cu-Sulfat und Cu-Alanin wirken ebenfalls ovulationsauslösend. Die wirksame Menge liegt jedoch nur wenig unter der Dosis letalis. Diese Verbindungen scheinen weniger geeignet zu sein.

- c. Cadmium-Acetat und Cadmium-Chlorid (15-20 mg) induzierten ebenfalls die Ovulation. Ovarien und Eileiter zeigten jedoch z. T. ausgedehnte Hämorrhagien. Zwei Tiere ovulierten, obwohl sie gravid bzw. pseudogavid waren. Die Ovulation trat innerhalb 24 Stunden auf.
- d. Versuche mit Salzen von Ba, Co, Au, Fe, Mn, Ni, Ag, Zn verliefen negativ.

Venge (181) reproduzierte diese Versuche und fand:

Nach einer Injektion von 12,5 bis 15 mg Cu-Acetat ovulierten 18 von 30 Kaninchen. Durchschnittlich konnten 8 Eizellen gefunden werden. Bei den restlichen Tieren wiesen einige Ovarien große, reife Follikel auf, aus welchen die Eizellen durch Punktion gewonnen werden konnten. Als optimales Intervall zwischen Injektion und Eigewinnung werden 18 Stunden angesehen.

Diese positiven Ergebnisse von Venge (181), Marshall u. a. (130) und Emmens (84) verdienen, daß weitere Untersuchungen angestellt werden über die Verwendbarkeit von Schwermetallsalzen zur Beeinflussung der Ovulation. Fragen der Toxizität dieser Substanzen, der Befruchtungsfähigkeit der auf diese Weise ovulierten Eizellen sowie die Anwendbarkeit bei anderen Tierarten bleiben noch abzuklären.

3. Hormonelle Beeinflussung der Superovulation beim Kaninchen

a) Nomenklatur und Wirkung von Gonadotropinen

Unsere Kenntnisse über Herkunft, Herstellung und Wirkung von Stoffen, welche auf die Gonaden wirken, sind noch recht jung. Diese Stoffe werden als gonadotrope Hormone oder Gonadotropine bezeichnet. Da die ersten Untersuchungen ungefähr zur selben Zeit und in verschiedenen Ländern durchgeführt wurden, herrscht bezüglich Nomenklatur und Standardisierung ein eigentliches Chaos, welches durch die phantasievolle Namensgebung der pharmazeutischen Industrie noch gefördert wird. Ein Vergleich zwischen einzelnen Präparaten ist oft nur schwer oder überhaupt nicht möglich. Aus diesem Grunde wird dem Abschnitt "Hormonelle Beeinflussung der Ovulation" zuerst eine Übersicht vorangestellt über Nomenklatur, Standardisierung und Wirkungsweise der gonadotropen Hormone. Ausführlichere Beschreibungen finden sich bei Wenner (187) und Labhart (118).

Hypophysäre Gonadotropine

Sie werden meist als Hormongemische verwendet in Form von Extrakten der gesamten Hypophyse oder nur des Hypophysenvorderlappens (HVL) von geschlachteten Tieren. Dabei überwiegen beim Pferd die follikelstimulierenden, beim Rind die Wachstumshormone (8). Die Wirkung einer Zubereitung ist abhängig von der Herstellungsweise. Solche Präparate müssen in biologischen Versuchen (an infantilen oder kastrierten Ratten und Mäusen) auf ihre Wirksamkeit getestet werden.

Heute ist es möglich, durch verschiedene biochemische Methoden einzelne Hormonfraktionen isoliert darzustellen. Sie werden in Tierversuchen getestet und in internationalen Einheiten (IE) standardisiert.

1. FSH (Follicle Stimulating Hormone)

- = FRH (Follikelreifungshormon)
- = Prolan A
- = Thylakentrin

- 1 I.E. entspricht 0,1 mg Standardpräparat.

- 1 Mäuseuterus-Einheit (Uterus-ME, Levin-Tyndale) ist diejenige Menge FSH, welche das Uterusgewicht einer infantilen Maus um 300 % vergrößert.

- In grober Annäherung gilt:

1 Aschheim-Zondek-ME = 100 Uterus-ME.

- 1 RE (Ratteneinheit) nach Evans entspricht der kleinsten Hormonmenge, die in 3 Tagen verabfolgt, bei 26 - 28-tägigen, hypophysenlosen weiblichen Ratten das Auftreten normaler Follikel in den Ovarien bewirkt.

2. LH (Luteinisierungshormon)

- = Luteinizing Hormone
- = ICSH (Interstitial Cell Stimulating Hormone)
- = Prolan B
- = Melakentrin

- 1 IE entspricht 0,1 mg Standardpräparat

- 1 RE nach Greep ist in der Menge eines Präparates enthalten, die bei 21 Tage alten hypophysenlosen männlichen Ratten am 5. Tag nach der Zufuhr eine Verdoppelung der ventralen Prostata hervorruft.

- 1 RE nach Evans ist in der Menge eines Präparates enthalten, die bei

26-28 Tage alten, hypophysenlosen weiblichen Ratten die interstiellen Zellen des Ovars innerhalb von 72 Stunden wieder herstellt.

- 1 ME nach Zondek ist diejenige kleinste Hormonmenge, die, auf 6 Portionen verteilt, im Verlauf von 36 Stunden injiziert, 100 Stunden nach Beginn der Injektion im Ovarium einer infantilen Maus einen Follikel in einen Luteinkörper umwandelt.

3. CU (Castrate Urine Factor)

Gonadotropes Hormon aus Kastratenharn. Entspricht wirkungsmäßig dem FSH.

Extrahypophysäre Gonadotropine

1. HCG (Human Chorionic Gonadotrophin)

= PU (Pregnancy Urine Factor)

= Prolan B

Wird in Blut, Ham und Placenta von schwangeren Frauen gefunden. Die biologische Wirkung entspricht weitgehend dem Luteinisierungshormon.

1 IE entspricht 0,1 mg Standardpräparat.

2. PMS (Pregnant Mares' Serum)

Wird von graviden Stuten gewonnen zwischen dem 50. und 150. Tag der Trächtigkeit. Es enthält beträchtliche Mengen eines Gonadotropins, dessen biologische Eigenschaften weitgehend mit dem FSH übereinstimmen (8).

1 IE entspricht 0,25 mg Standardpräparat.

Nach der Wirkung der Hormone auf die Ovarien unterscheidet man:

1. Gonadotropine, welche das Follikelwachstum stimulieren:

FSH

CU

PMS

2. Gonadotropine, welche den Sprung des reifen Follikels und seine Umwandlung in einen gelben Körper veranlassen:

LH

HCG

PU

b) Die Wirkung der gonadotropen Hormone beim Kaninchen

Über die hormonelle Auslösung der Superovulation beim Kaninchen liegen zahlreiche Arbeiten vor. Fast alle Autoren wenden Behandlungsmethoden an, wie sie von Pincus (153) und Parkes (143) beschrieben werden. Durch die Injektion von FSH-Präparaten während einiger Tage wird eine folliculäre Phase induziert. Anschließend erfolgt eine intravenöse Injektion eines Luteinisierungshormones zur Auslösung des Follikelsprunges.

Zusammenstellung der Ergebnisse nach verschiedenen Behandlungsmethoden zur Auslösung der Superovulation beim Kaninchen:

BEHANDLUNG		Ovulationen im Durch- schnitt	Gewonnene Eizellen %	Literatur- Angabe
Stimulierung des Follikelwachstums	Auslösung der Ovulation			
an 5 T. je 2 mg Pfd-HVL-Extrakt	am 6. T. 20 IE HCG	44	76	77
6 x je 2 mg FSH in 12-stündigem Inter- vall	8-12 Std. nach der letzten Inj. 15 mg FSH + 2 mg LH i/v.	28,5		153
6 x je 1,5 - 15 mg Pfd.HVL-Extr. in 12-Std. Intervall	0,13 - 15 mg Pfd. - HVL-Extrakt	39,7		153
6 x je 2 mg FSH in 12-std. Intervall	50 RE Schaf-HVL- Extrakt			54

Pincus (153) prüfte verschiedene Präparate auf ihre Wirksamkeit und fand:

- Nachdem die Dosis des FSH eine bestimmte Höhe erreicht hat, (Total 12 mg), kann durch weitere Steigerung die Ovulationszahl nicht erhöht werden.
- PMS ist weniger wirksam als Hypophysenextrakte. (max. 32 Ovulationsstellen gegenüber 60 und mehr). Cystöse und hämorrhagische Follikel treten gelegentlich auch nach FSH-Injektionen auf, aber nie in dem Maße wie bei PMS.

- Die kombinierte Anwendung von FSH und LH verdrei- bis vierfacht die Zahl der ovulierenden Follikel.
- Ein unfraktioniertes, gereinigtes HVL-Extrakt wurde für wirksamer befunden als die kombinierte Behandlung mit FSH und LH.
- Bei allen Kaninchen waren die superovulierten Eizellen befruchtet worden.
- 3 Tage nach der Ovulation können häufig keine Eizellen mehr im Eileiter gefunden werden. Das gestörte hormonale Gleichgewicht führt zu einer beschleunigten Eileiterpassage.
- Paarung im Moment der ovulationsauslösenden Injektion erhöht die Zahl der Eizellen nicht.
- Die Kopulation kann die ovulationsauslösende Injektion nicht ersetzen.

Über die Auslösung einer "spontanen" Ovulation, d. h. ohne neurogene Stimulierung der Hypophyse durch den Koitus, berichten Sawyer u. a. (167):

Behandlung:

An 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 85 mg Östradiol. 4 Stunden nach der zweiten Injektion 2 mg Progesteron.

Resultate:

Von 10 Kaninchen ovulierten 4 (40 %). Alleinige Behandlung mit Östrogenen oder mit Progesteron bewirkte in keinem Fall die Ruptur der Follikel.

4. Die Ovulation beim juvenilen Kaninchen

Auf die Bedeutung der Gewinnung von Eizellen juveniler Tiere wurde bereits hingewiesen. Über die Auslösung frühzeitiger, geschlechtlicher Entwicklungen bei verschiedenen Tieren berichteten folgende Autoren:

Ratten: Cole (70), Austin (12),

Mäuse: Smith u. a. (170).

Kaninchen: Hertz u. a. (112), Parkes (143), Adams (1, 2), Lloyd (123).

Schwein: Casida (39).

Rind: Casida u. a. (42), Marden (127), Black u. a. (27).

Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, daß die Eizellen der noch nicht geschlechtsreifen Tiere befruchtungsfähig sind und daß aus ihnen durchaus eine Gravidität resultieren kann. Die Nachkommen sind jedoch sehr klein, falls sie überhaupt ausgetragen werden. Eine Übertragung der Eizellen von juvenilen Tie-

ren auf geschlechtsreife Tiere würde diese Schwierigkeit umgehen, wodurch die Generationsfolge wesentlich verkürzt werden könnte.

Untersuchungen von Adams (1) über den Zeitpunkt der erstmöglichen Ovulation beim Kaninchen lieferten folgende Ergebnisse:

- a. Beginn der Behandlung (nach Pincus 153) - s. S. 9/10 - mit 10 Wochen: Die Ovarien behielten ihr infantiles Aussehen.
- b. mit 12 Wochen: Alle Tiere zeigten nach der Injektion brünstiges Verhalten. Bei allen Tieren ovulierten die reifen Follikel (durchschnittlich 15).
- c. mit 14 Wochen: wie b.
- d. Die Eizellen der juvenilen Tiere waren befruchtungsfähig. Paarung im Zeitpunkt der ovulationsauslösenden Injektion ergab Trächtigkeit. In einem Fall gebar ein 83 Tage altes Kaninchen 31 Tage nach der Kopulation 2 Junge von 47 g und 37 g. Das Tier bereitete jedoch kein Nest und nahm die Jungen nicht an.
- e. Die Übertragung von befruchteten Eizellen eines juvenilen Tieres auf ein geschlechtsreifes Empfängertier ergab normale Trächtigkeit.

5. Die Ovulation beim pseudograviden Kaninchen

Hammond zeigte (zit. n. 10), daß beim Kaninchen während der Gravidität oder Pseudogravidität die Kopulation wohl ausgeführt wird, daß aber die Ovulation unterbleibt. Sobald jedoch die gonadotropen Hormone zur Verfügung standen, wurde es möglich, den Follikelsprung trotz der vorhandenen Corpora lutea auszulösen.

Austin (10) berichtet über folgende Ergebnisse:

a. Behandlung

23 Kaninchen erhielten zur Provozierung der Pseudogravidität eine intravenöse Injektion von 10 IE HCG. In verschiedenen Intervallen nach dieser Injektion wurde die Ovulation ausgelöst durch eine intravenöse Injektion von 50 IE HCG. Gleichzeitig wurden die Kaninchen künstlich besamt.

b. Resultate

- zwischen dem 3. und 16. Tag der Pseudogravidität konnte jederzeit die Ovulation provoziert werden. Die durchschnittliche Zahl der zur Ovulation gelangenden Follikel betrug 6,3.
- Zwischen dem 4. und 12. Tag der Pseudogravidität werden keine Eizellen befruchtet. Außerhalb dieser Zeitspanne können segmentierte Eizellen gefunden werden.

- Histologische Untersuchungen von Schleimhautabstrichen ergaben, daß die Spermien während der Pseudogravidität die Eileiter nicht erreichen.
- Die intratubale Insemination 4 - 5 Stunden nach der ovulationsauslösenden Injektion (= 5-6 Stunden vor dem Follikelsprung) lieferte bei pseudograviden Kaninchen eine gegenüber Kontrolltieren drei Mal geringere Anzahl befruchteter Eizellen.
- Befruchtete Eizellen, die auf pseudogravide Kaninchen übertragen werden, entwickeln sich bis zu Blastocysten. Sie werden jedoch nicht in den Uterus weiterbefördert.

Daß während der Pseudogravidität die Ovulation provoziert werden kann, geht auch aus den Untersuchungen von Emmens (84) hervor. Nach der Injektion von Cadmium-Salzen ovulierten ein gravides und ein pseudogravides Kaninchen (s. S. 6).

6. Superovulation und Fruchtbarkeit

Daß superovulierte Eizellen normal befruchtungs- und entwicklungsfähig sind, zeigen die Übertragungsversuche von Warwick u. a. (183) und Chang (48). 53 von einer einzigen Häsin gewonnene Eizellen, die auf vier Tiere transplantiert wurden, ergaben 45 normale Junge.

In einem anderen Fall gelang es, von 35 Eizellen, die auf drei Tiere übertragen wurden, 26 Junge zu erhalten. Dies ergibt eine Fruchtbarkeitsrate von 74 - 85 %. Dabei sind die Verluste, welche der Eiübertragung zuzurechnen sind, nicht berücksichtigt.

Diese Zahlen decken sich mit den Angaben von Boyarsky u. a. (31).

D. Superovulation bei Maus und Ratte

Über die Verwendung gonadotroper Hormone zur Beeinflussung der Ovulation berichteten bei

Mäusen: Engle (85)

Ratten: Cole (71), Evans u. Simpson (86).

E. Ovulation und Superovulation beim Rind

In Bezug auf die Ovulation und die Möglichkeiten zu ihrer Beeinflussung liegen die Verhältnisse grundverschieden von denen beim Kaninchen. Einerseits kann die Ovulation nicht durch die Paarung provoziert werden, weil der Follikelsprung sich spontan ereignet, und zwar innerhalb eines ganz bestimmten Zyklus; andererseits ermöglichen es die anatomischen Verhältnisse, den Eierstock vom Rektum aus zu palpieren. Durch die Enukleation eines Corpus luteum kann der Zyklus auf einfache Weise unterbrochen werden.

Der willkürlichen, bezüglich Intensität und zeitlichen Auftretens steuerbaren Ovulation kommt eine vielfache Bedeutung zu. Erstens sind entsprechende Kenntnisse wichtig für die Behandlung von Sterilitäten, deren Ursache in einer Anöstrie irgendwelcher Genese liegt, und zweitens ist die kontrollierbare Ovulation eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Transplantation von Eizellen: Sei es zur Gleichschaltung des Geschlechtszyklus von Spender- und Empfängertier, sei es zur Erzeugung einer überdurchschnittlichen Zahl von Eizellen. Die zu diesem Problem veröffentlichten Arbeiten sind recht zahlreich. Zur Anfertigung der Tabellen wurden Arbeiten verwendet, deren Ergebnisse als mittlere Werte angesehen werden dürfen. Über die Möglichkeit, Brunst und Ovulation zu verzögern durch Behandlung der Kühe mit Atropin und Progesteron, wird im Kapitel "Gleichschaltung des Geschlechtszyklus" (s. S. 49) berichtet.

1. Die spontane Ovulation

Unter natürlichen Verhältnissen und bei normal funktionierendem Geschlechtszyklus vollzieht sich der Follikelsprung im Zusammenhang mit der periodisch wiederkehrenden Brunst. Die Angaben über das zeitliche Verhältnis schwanken zwischen 2 und 28 Stunden post oestrus. Als mittlere Werte können 11 - 12 Stunden angesehen werden (8, 68, 77, 99, 109, 129). Klar erkennbar ist, daß die Ovulation in einer bestimmten Relation zum Brunstende steht. Auf den Zusammenhang von Umwelt, psychischer Reaktion des Tieres und Auftreten der Brunst weist Ernst hin (200).

2. Die Ovulation nach dem Abdrücken eines Gelbkörpers

Das Corpus luteum entsteht nach jeder Ovulation durch Umwandlung der Follikelwand aus den Zellen der Granulosa und der Theca interna. Es übernimmt die Funktion einer endokrinen Drüse. Sein Hormon, das Progesteron, bereitet den Uterus für die Nidation der Eizelle vor und unterdrückt - über die Hypophyse - das Wachstum weiterer Follikel. Tritt keine Konzeption ein, so bildet sich der Gelbkörper zurück (Regressionsphase). Dadurch fällt die brem-

sende Wirkung des Progesterons aus, es können weitere Follikel heranreifen, was zu Brunst und schließlich zu einer erneuten Ovulation führt.

Durch das Abdrücken des Gelbkörpers wird der normale Ablauf des Geschlechtszyklus unterbrochen. Die Eukleation kann zwischen dem 5. und 18. Tag nach der vorangegangenen Brunst erfolgen. Der günstigste Zeitpunkt jedoch liegt zwischen dem 8. und 12. Tag des Zyklus, während des Blütestadiums des Corpus luteum (77). Die Kühe werden in der Regel 2-4 Tage später rindrig. Dowling (77) gibt an, daß 90 % der Tiere zwischen dem zweiten und vierten Tag brünstig wurden. Die Eizellen, die nach dem Abdrücken des Gelbkörpers zur Ovulation kamen, waren zu 100 % befruchtet und weiterentwickelt worden. Zu gleichen Ergebnissen kommen auch andere Autoren (99, 119).

Diese Art der Ovulationsauslösung ist recht befriedigend und es stellt sich die Frage, ob es möglich ist, durch zusätzliche Anwendung von Gonadotropinen eine multiple Ovulation auszulösen.

3. Die hormonale Beeinflussung der Ovulation

Die Fülle der zu diesem Problem veröffentlichten Arbeiten läßt vier verschiedene Wege erkennen, die zu Follikelstimulierung und Ovulationsauslösung führen. Sie sollen im Folgenden einzeln besprochen werden.

a. PMS, in der folliculären Phase des Sexualzyklus subkutan injiziert, ca. 4 Tage vor der Brunst.

Die folgende Tabelle vermittelt eine Übersicht über die verschiedenen Behandlungserfolge.

Dosis in I. E.	Tiere mit Ovulat. %	Durchschn. Zahl der Ovulat.	EIZELLEN		Bemerkungen	Literatur
			Gewonnen %	Befruchtet %		
4000	100	2-30	50			90
3000		12	22	44		77
2000 bis 2500		2-5			1	103

- 1) Zur Auslösung von Mehrlingsträchtigkeit. Implantation von mehr als drei Früchten führte zum Abort:-

Diskussion

- PMS induziert nur in der folliculären Phase die Ovulation, d.h. während des Regressionsstadiums des Gelbkörpers.
- Der Schwellenwert für PMS liegt bei 1500 IE (90). Bei 2000 IE liegen die ovariellen Reaktionen innerhalb der physiologischen Grenzen (77).
- Nach der Injektion von 3000 IE und mehr kommt es leicht zur Überstimulierung der Ovarien, zur Heranbildung großer, oft hämorrhagischer, nicht ovulierender Follikel (77, 90, 193).
- Eine intravenöse, ovulationsauslösende Injektion am Tag der Brunst ist nicht unbedingt erforderlich.

b. PMS, ca. 4 Tage vor der Brunst + am Tage der Brunst eine intravenöse Injektion von Luteinisierungshormon.

(34, 119, 161, 193)

- Die größte Ovulationsrate ergibt sich, wenn zwischen den beiden Injektionen eine Zeitspanne von 5 - 11 Tagen liegt.
- Vergleiche zwischen der Wirkung des endogenen LH allein und der Ergänzung durch HCG im Anschluß an die PMS-Injektion ergaben beinahe eine Verdoppelung der Zahl der ovulierenden Follikel in letzterem Falle.
- Das unfractionierte Extrakt von Schafhypophysen erzeugt nach der intravenösen Injektion mehr Ovulationen als HCG, hat aber den Nachteil, daß mehr Follikel zystös entarten als bei der Kombination PMS + HCG.

c. Hypophysenextrakte von Pferd und Schaf, subcutan injiziert während der folliculären Phase des Geschlechtszyklus + i. v. Injektion eines luteinisierenden Hormones zur Auslösung der Ovulation

Ergebnisse: (Übersicht s. Tabelle folg. Seite)

- Die Hypophysenextrakte lösen zu jedem Zeitpunkt des Geschlechtszyklus die Ovulation aus (42, 45, 77, 90).
- Die i. v. Injektion eines gonadotropen Hormones am Tage der Brunst erhöht die Zahl der ovulierenden Follikel (42, 119, 161, 178, 193).
- Die Ovulation erfolgt 36-48 Stunden nach der Injektion von HCG.

BEHANDLUNG	% Kühe mit Ovulat.	♂ Zahl Follikel	% Eizellen		Lit.
			Gewonnen	Befr.	
je 100 mg HVL-Extr. an 3 aufeinanderfolg. Tagen, Beginn 6 T. vor der Brunst		6,5	74	92	77
350 mg HVL-Extr. zwischen d. 14. u. 21. T. d. Zyklus	100	2-20			90
Sf-HVL-Extr. 3 x s. c. + am Tage d. Brunst i. v.	85,7		1)		42
während 5 T. FSH s. c., am 6. Tag HCG i. v.	83	23,4	36,7	74	193
Implantation von Sf-H-Extr. gefolgt von einer i. v. Injektion		23,4	46,4	53	178

1) Von 7 Kühen ovulierten 6. 3 Kühe lieferten total 15 Embryonen, 1 Kuh abortierte, 2 Tiere wurden nicht trächtig.

- Die Injektion von Hypophysenextrakten in der follikulären Phase des Sexualzyklus liefert die besten Ergebnisse, sowohl bezüglich Eiausbeute als auch bezüglich Fruchtbarkeit (42, 77, 102, 193).
- Die Hypophysenextrakte bewirken lediglich eine Vergrößerung der Ovarien. Eine Überstimulierung wurde nicht beobachtet. Die Follikel reifen gleichmäßig heran und ovulieren ungefähr zur selben Zeit.
- In Anwesenheit eines aktiven Corp. lut. kann die Ovulation provoziert, die Befruchtung jedoch nur schwer erreicht werden (7, 41, 42, 45, 77, 161, 193, 199).
- Die Zahl der ovulierenden Follikel kann sehr groß sein (bis 51) (77).
- Die Injektion von 5-10 mg Hypophysenextrakten unmittelbar vor der Brunst verkürzt das Intervall zwischen Brunstende und Ovulation von durchschnittlich 11,7 Stunden auf 1 Stunde. Die Brunstlänge wird nicht beeinflusst (129).
- Der Prozentsatz der gewonnenen Eizellen (40 - 75) und der davon befruchteten (4 - 92) variiert sehr stark. Es ist dies ein Hinweis auf die geringe Zuverlässigkeit der Behandlungs- und Eizellgewinnungsmethoden.

d. Injektion von gonadotropen Hormonen in der lutealen Phase des Geschlechtszyklus in Verbindung mit der Eukleation des Corpus luteum

Übersicht über die Ergebnisse nach verschiedenen Behandlungsmethoden:

BEHANDLUNG	Tage vor (-) bzw. nach (+) d. Eukleat.	Ovulation		% Eizellen		Bemerkungen	Lit.
		%	Ø Zahl	Gewonnen	Befr.		
3000 IE PMS	- 4		6	38	38	1)	77
5000 IE PMS	gleich- zeitig	88	2, 6			2)	102
1500 IE	- 5 bis + 2	64		44 ⁺⁾		3)	102
2000 IE	- 3 und - 2		1-2			4)	103
2000 IE 1000 IE	- 2 gleichz.		1-4			4)	103

+) durchschnittlich 3 pro Tier

1) zahlreiche große, nicht ovulierende Follikel.

2) 41 % wiesen 4 - 30 Ovulationsstellen auf.

3) 20 % wiesen 3 - 14 Ovulationsstellen auf.

4) Untersuchungen zur Erzeugung von Mehrlingsträchtigkeit.

Diskussion der Ergebnisse:

- Die Injektion von gonadotropen Hormonen vor der Eukleation eines Corpus luteum bewirkt die Ovulation zahlreicher Follikel.
- Das Eintreten der Brunst wird durchschnittlich um einen Tag beschleunigt.
- Durch die intravenöse Injektion eines LH (z. B. HCG) im Zeitpunkt des Abdrückens eines Gelbkörpers kann der Prozentsatz der ovulierenden Follikel erhöht werden (161).
- Diese Methode ist unbefriedigend. Viele Follikel werden wohl größer, ovulieren jedoch nicht. Bei 20 % aller Rinder wird mit dem Abdrücken des Gelbkörpers auch ein Follikel zerstört (103).

4. Der Einfluß des Corpus luteum auf die Superovulation

Auf die Funktion des Gelbkörpers innerhalb des natürlichen Ablaufs des Geschlechtszyklus wurde bereits hingewiesen. Nun hat sich aber bei den Untersuchungen zur Auslösung multipler Ovulationen gezeigt, daß das Corp. lut. einen komplizierten Einfluß ausübt auf die verschiedenen am Geschlechtsapparat sich abspielenden Vorgänge. Die potentielle Fertilität von Oozyten, die nach der Anwendung von hypophysären Gonadotropinen ovuliert werden, wird beeinflußt von der Phase des Geschlechtszyklus im Zeitpunkt der Behandlung (44).

a. Corpus luteum und Ovulationsquote

Folley u. a. (90) konnten während der lutealen Phase des Sexualzyklus bei 27 % aller Kühe eine Ovulation auslösen.

Willet u. a. (193) sogar bei 5 von 6 Tieren (83 %).

In vergleichenden Versuchen ermittelte Rowson (161) folgende Resultate nach der Injektion von PMS und LH:

	Kühe mit aktivem C.l.		ohne aktives C.l.	
	Anzahl Follikel	Anzahl Ovulationen	Follikel	Ovulat.
	5 - 45	0 - 40	2 - 46	0 - 12
Total von je 14 K.	313	184	273	39
in %		52		14

Besitzt ein Tier also im Zeitpunkt der Behandlung mit Hormonen ein aktives Corpus luteum, so ist die Zahl der Ovulationen um das Dreifache größer. Unterbleibt jedoch die Injektion eines LH, so kommen keine Ovulationen vor.

Gleiche Resultate erzielten auch Casida u. a. (42). Willet u. a. (193) erhielten gerade umgekehrte Ergebnisse; während der follikulären Phase wurden annähernd doppelt so viele Eizellen ausgeschieden. Dieser Widerspruch ist offenbar zurückzuführen auf Verschiedenheiten der Behandlungsmethoden sowie der verwendeten Gonadotropine.

Die Tatsache, daß bei Anwesenheit eines Corpus luteum mehr Follikel zur Ovulation gelangen, ist recht bemerkenswert. Es scheint, daß während der durch Gonadotropine stimulierten Follikelreifung das Progesteron des Corp. lut. die

Ruptur der Follikel verzögert mit dem Effekt, daß mehr Follikel heranreifen können, so daß eine viel größere Zahl auf die intravenöse Injektion von LH hin ovuliert. Eine entsprechende Versuchsanordnung scheint die Richtigkeit dieser Hypothese zu bestätigen (161):

Bei 6 Kühen wurde das C.l. entfernt und gleichzeitig 3600 IE PMS injiziert. Das sonst vom Gelbkörper gelieferte Prog. wurde durch tägliche Gaben von 20 mg während 4 Tagen substituiert. 1 Tag später erfolgte die ovulationsauslösende i. v. Injektion von LH.

	Follikel	Ovulationen
Grenzwerte	3 - 35	3 - 33
Total von 6 Kühen	150	82
In Prozent		55

Auch bei diesem Versuch gelangten über 50 % der Follikel zur Ovulation.

b. Corpus luteum, Eileiterpassage und Fruchtbarkeit

Rowson (161) stellte Untersuchungen an über die Fruchtbarkeit von Eizellen, deren Ovulation in Anwesenheit eines aktiven Gelbkörpers provoziert worden war. Von 757 Eizellen war nicht eine einzige befruchtet worden. Die meisten hatten schon innerhalb von 1 - 4 Tagen den Uterus erreicht - zu einem Zeitpunkt also, an dem sie sich normalerweise noch im Eileiter befinden (98). Das C.l. wirkt offensichtlich beschleunigend auf die Wanderung der Oozyten im Eileiter. Diese Tatsache wird durch die Ergebnisse anderer Autoren erhärtet (7, 54, 62, 77, 153, 156, 161, 178, 188, 198). Die daraus resultierenden niedrigen Fruchtbarkeitsziffern werden bestätigt durch zahlreiche Arbeiten (7, 41, 42, 44, 137).

Die Ursache der Unfruchtbarkeit liegt aber nicht bei der Eizelle. Durch reziproke Transplantation von Eizellen brünstiger und scheinträchtiger Kaninchen konnten Black u. a. (25) zeigen, daß solche Oozyten zur Befruchtung und normalen Weiterentwicklung befähigt sind. Rowson (161) nimmt an, daß das Progesteron den descendierenden Flüssigkeitsstrom durch den Eileiter verstärkt, so daß erstens die Eizellen rascher transportiert, zweitens die Spermien am Erreichen der Eileiterampulle gehindert werden. Ein entsprechender Versuch, durch Injektion von Östrogenen eine bremsende Wirkung auszuüben, und dadurch die

Richtigkeit dieser Annahme zu bestätigen, fiel positiv aus. Hingegen waren die Eizellen nicht befruchtet worden.

Auf die erhöhte Infektionsempfänglichkeit des Uterus während der lutealen Zyklusphase wird im Kapitel VI. D. näher eingegangen. Wie weit sie für die Mißerfolge bei der Besamung und Befruchtung superovulierter Eizellen verantwortlich ist, kann kaum beurteilt werden.

5. Diskussion

Das Rind nimmt bezüglich der verschiedenen Zyklusphasen eine Sonderstellung unter unseren Haustieren ein. Bei der Stute überwiegt innerhalb des ovariellen Zyklus die follikuläre Phase, so daß die Ovulation durch Gonadotropine leicht ausgelöst werden kann (36, 74). Bei den kleinen Labortieren, Maus, Ratte, Kaninchen weist der Geschlechtszyklus praktisch keine luteale Phase auf. Beim Rind hingegen dominiert die luteale Phase stark, beansprucht sie doch fast die ganze Länge des Geschlechtszyklus. Die Anwendung von gonadotropen Hormonen bleibt daher fragwürdig, solange der Eierstock ein aktives Corpus luteum aufweist. Daraus folgt, daß multiple Ovulationen sich innerhalb kürzester Zeit folgen müssen, nicht daß frisch gebildete Gelbkörper der ersten Ovulationen die Befruchtung der später ovulierten Eizellen beeinträchtigen können (59). Darüber hinaus nimmt Chang (57) an, daß die Eizellen der Ungulaten ihre Befruchtungsfähigkeit schneller verlieren als die der anderen Säuger, welche die - das Ei einhüllende - Zellen der Corona radiata des Cumulus oophorus länger behalten. Die genaue Wahl des Zeitpunktes der Besamung bzw. der Paarung ist daher wichtig.

6. Die Ovulation beim Kalb

Höfliger (201) weist darauf hin, daß im Kalbsovar namentlich in den ersten 3 Monaten tiefgreifende Organveränderungen vor sich gehen. Parallel mit dem starken Wachstum der Keimdrüse geht eine gesteigerte Heranbildung und Reifung von Follikeln einher, so daß beim juvenilen Ovar alle Übergangsformen zu finden sind zwischen dem Primordialfollikel und dem Graaf'schen Follikel. Dieser Befund läßt erwarten, daß durch entsprechende Hormoninjektionen auch der Follikelsprung ausgelöst werden kann.

Untersuchungen über die Möglichkeit, bei Kälbern die Ovulation zu provozieren, um wertvolles weibliches Keimmateriel frühzeitig der Zucht zuzuführen, liegen vor von Marden (127), Casida u. a. (42) und Black u. a. (27). Die folgende Tabelle vermittelt einen Überblick über Behandlung und Resultate.

BEHANDLUNG	Anzahl Tiere			+)	Lit.
	Total	Mit Ovu- lat.	Mit mul- tipl. Ovul.		
Sf-HVL-Extrakt, s. c. während 1 - 6 Tagen	10	4	2	6	42
Sf-HVL-Extrakt, i. v., während 1 - 3 Tagen	14	10	8	29	42
FSH, während 3-6 Tagen s. c., 24 Std. später LH, i. v.	32	16	3	38	27
während 3-5 Tagen 2 x tägl. FSH, anschließend LH, i. v.	23	15	4	118	127

+) Total Corpora lutea der Tiere mit multiplen Ovulationen.

Diskussion der Ergebnisse:

- Nach der Injektion von Follikelreifungshormonen können Ovulationen schon vor dem Ende des ersten Lebensmonates auftreten.
- Die von sehr früher Ovulation stammenden Eizellen sind befruchtungsfähig, doch ist der Prozentsatz von Eiern, die nach der künstlichen Besamung befruchtet werden, gering.
- Multiple Ovulationen lassen sich weder mit FSH noch mit LH oder durch kombinierte Anwendung der beiden Gonadotropine erzwingen, obwohl sie gelegentlich vorkommen.
- Die Ovulation ist beim Kalbe aller Altersstufen bis zu 8 - 9 Monaten nicht von Brunsterscheinungen begleitet.
- Superovulation und Entwicklung vieler Corpora lutea kann im allgemeinen hervorgerufen werden, sofern die Verabreichung von FSH ein zweites Mal nach einer Periode mit Lutealaktivität wiederholt wird.
- Das Alter des Kalbes hat nur einen geringen Einfluß auf die Entwicklungsfähigkeit von Follikeln nach mehreren Hormoninjektionen.

F. Ovulation und Superovulation beim Schaf

1. Brunst und Ovulation

Aus den Untersuchungen von Anderson (5) über die zeitliche Relation zwischen Brunst und Ovulation sei zusammengefaßt folgendes erwähnt:

- Die Ovulation tritt erst nach der Brunst ein.
- Schafe, deren Brunst 30 und mehr Stunden dauert, ovulieren kurz nach Brunstende.
- Die Ovulation richtet sich - unabhängig von der Brunstdauer - nach dem Ende der Brunst.

BEHANDLUNG	Anzahl Schafe				Lit.
	Total	Mit Ovul.	Mit Brunst	Gravid od. mit befr. Eiz.	
1000 IE PMS	7	4	0	0	158
35 mg Progesteron + 24 Std. später 1000 IE PMS	7	7	0	0	158
35 mg Progesteron + 48 Std. später 1000 IE PMS	7	7	3	2	158
einmalige Injektion von Gonadotropinen	268			2	7
zweimalige Inj. i. Abstand von 16 Tagen	385			63 = 16 %	7
während 3 Tagen je 2 x 12,5 mg Prog., am 5. T. 1000 PMS	18	16 ⁺	16		159

+) Die beiden nicht ovulierenden Schafe wiesen ein aktives C.l. auf.

Aus den zahlreichen Arbeiten über die hormonale Ovulationsauslösung beim Schaf können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Die erste Ovulation der Zucht-"Saison" ist normalerweise nicht von äußerlich erkennbaren Brunstsymptomen begleitet (96).
- Die Injektion von Gonadotropinen in Anwesenheit eines aktiven Corp. lut. löst wohl die Ovulation aus; dagegen resultieren aus solchen Eizellen keine Trächtigkeiten (7).
- In Abwesenheit eines C.l. kann beim anöstrischen Schaf die Ovulation ausgelöst werden durch 800 - 1000 IE PMS. Die Brunst tritt jedoch nicht in Erscheinung (7, 101, 157, 158, 159).
- In Gegenwart eines sich zurückbildenden C.l. kann durch 800 PMS sowohl Brunst als auch Ovulation erzeugt werden. Solche Eizellen sind befruchtungs- und entwicklungsfähig (157).
- Durch 800 IE PMS kann während der anöstrischen Phase in Gegenwart eines aktiven C.l. weder Brunst noch Ovulation provoziert werden. Gelegentlich tritt Brunst auf, aber ohne Ovulation sondern mit großzystischer Degeneration der Ovarien (157).
- Während der Zuchtsaison kann die Ovulationsquote durch PMS erhöht werden (157).
- In Bezug auf die Ansprechbarkeit der Ovarien auf PMS-Injektionen bestehen rassetypische Unterschiede (115, 157).
- Injektionen in steigenden Dosen zeigten keine bessere Wirkung als einmalige Injektionen. Ovulation (ohne Brunst) tritt auf, sobald ein gewisser Schwellenwert (ca. 400 IE) überschritten wird (157).
- Die Ovulation tritt innerhalb von 48 Stunden nach der Injektion auf.
- Injektionen von Testosteronpropionat vor, gleichzeitig oder nach der PMS-Behandlung lieferten sehr variable Ergebnisse, so daß keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden können über die Wirkungsweise (72, 157).
- Der geringe Prozentsatz von befruchteten Eizellen nach PMS-Injektionen läßt sich erklären durch die gestörte zeitliche Relation zwischen Brunst (Paarung) und Ovulation als Folge der Behandlung (101, 157, 159).
- Damit Brunst und Ovulation ausgelöst werden, ist es offenbar nötig, daß min. 48 Stunden vor der PMS-Behandlung ein schwer resorbierbares Progesteron-Präparat injiziert wird (158, 159). Das Mißverhältnis zwischen Brunst und Ovulation, wie es sich häufig nach PMS-Behandlungen einstellt, kann

dadurch korrigiert werden. Die zeitlichen Relationen bleiben dann innerhalb der physiologischen Grenzen: Brunst beginnt 24 - 36 Stunden nach der PMS-Behandlung, gefolgt nach 10 - 20 Stunden von der Ovulation.

Aus den vorliegenden Arbeiten geht hervor, daß die Auslösung der Ovulation beim Schaf während der anöstrischen Phase des Sexualzyklus noch ein ungelöstes Problem ist. Aus den Ergebnissen lassen sich immerhin einige Schlüsse ziehen, die für weitere Untersuchungen wegweisend sein können.

G. Ovulation und Superovulation bei der Ziege

Folley u.a. (91) untersuchten die Wirkung von PMS auf Follikelwachstum und Ovulation bei Ziegen, die während der anöstrischen Saison behandelt wurden. Alle Tiere wurden 168 Stunden nach der Injektion geschlachtet. Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt die folgende Tabelle:

Dosis I.E.	Ziegen			Ovulationen		Eizellen	
	Total	Mit Brunst	Mit Ovulat.	Durch- schnittl.	Total	Total	in %
200	4	0	2	1,5	-	-	-
400	5	1	3	2,0	-	-	-
600	9	7	8	4,6	33	18	54
800	10	6	10	3,4	21	14	66
1000	8	7	6	4,0	24	16	66
1200	10	9	8	4,5	30	24	80
1600	10	7	8	4,5	31	15	48
Total	56	37	45	3,5	139	87	62,6

Diskussion der Ergebnisse:

- Bezüglich der Wirkung nach intravenöser oder subkutaner Injektion konnte keine signifikante Differenz festgestellt werden.
- Auch niedrige Dosen von PMS vermochten die Ovulation auszulösen.

- Die höchste Zahl ovulierter Follikel betrug 15.
- In 4 von 32 Fällen konnten keine Eizellen gefunden werden.
- Von 139 ovulierten Follikeln konnten 87 Eizellen isoliert werden (62,6 %).
- Obwohl alle brünstigen Tiere gepaart worden waren, konnten von 87 Eizellen nur deren 4 mit Teilungsstadien beobachtet werden.
- Von total 44 anöstrischen Ziegen, welche eine einmalige Injektion von 1200 IE PMS erhalten hatten, wurden 35 brünstig und gepaart. 10 Ziegen warfen Junge (= 22,8 % aller behandelten Tiere).

H. Diskussion

In der Einleitung zum Kapitel Ovulation wurden zwei Fragen gestellt über die Beeinflußbarkeit der Ovulation. Wie müssen wir diese Fragen beantworten, nachdem wir die zur Lösung dieser Probleme hinzielenden Arbeiten und ihre Ergebnisse kennengelernt haben?

Gleich zu Anfang sei festgehalten: Die bis heute erzielten Resultate sind sehr unterschiedlich und vor allem noch unbefriedigend (20, 77, 59). Wohl gibt es bei allen Tieren Möglichkeiten, den Zeitpunkt der Ovulation willkürlich festzusetzen, die Zahl der zur Ovulation kommenden Follikel um ein Beträchtliches zu erhöhen. Maßgebend sind aber weniger die Ovulationsstellen oder die Corpora lutea, die man auf dem Ovar zählt, als vielmehr die Zahl der befruchteten oder befruchtungsfähigen Eizellen, die tatsächlich gewonnen werden können. Nun ist aber die Beurteilung einer Eizelle bezüglich Befruchtung oder Befruchtungsfähigkeit äußerst schwierig (s. Kap. Befruchtung). Genaue Angaben über nachweisbar befruchtete Eizellen sind eher spärlich. Soweit sie aus der Literatur ersichtlich waren, sind sie in den einzelnen Tabellen nach Möglichkeit berücksichtigt worden.

Auf die große Bedeutung des Corp. lut., das beim Rind einen dominierenden Einfluß ausübt auf das ganze Zyklusgeschehen, wurde bereits hingewiesen.

Ein weiteres Problem, dem bei der künstlichen Beeinflussung der Ovulation größte Beachtung geschenkt werden muß, liegt in der Aufrechterhaltung des hormonalen Gleichgewichtes. Die gonadotropen Substanzen werden nicht in ein hormonales Vakuum injiziert. Die endokrinen Drüsen des Tieres sind aktiv mitbeteiligt und werden bei Eingriffen in den Hormonhaushalt eine ganz bestimmte Reaktion zeigen, deren Richtung und Intensität nicht zum voraus abgeschätzt werden kann. Qualitative Veränderungen nach Hormoninjektionen manifestieren sich in Form von

- hämorrhagischen Follikeln (die Häufigkeit ihres Auftretens ist ungefähr proportional der Dosis des verabreichten Hormones).
- zystös entarteten Follikeln.
- Ovulationen unmittelbar im Anschluß an die Injektion (Schock-Effekt) (90, 157).
- Bildung abnorm kleiner Gelbkörper.

Wie steht es mit der Möglichkeit, bei einem Tier wiederholt eine multiple Ovulation zu provozieren? Willett (194) schreibt: Bei wiederholter Anwendung von PMS nimmt die Zahl der ovulierenden Follikel rasch ab. Nach drei bis vier Behandlungen ist die Zahl der provozierten Ovulationen nur wenig größer als bei Tieren, die nicht mit Gonadotropinen behandelt worden sind. Die Ursache dieses Refraktärstadiums ist noch ungeklärt (193).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die multiple Ovulation bei den Tieren durchaus provoziert werden kann, wenn auch heute noch mit wechselndem Erfolg. Die bisherigen Versuche waren richtungsweisend und lassen erkennen, welcher Zeitpunkt innerhalb des Sexualzyklus für eine ovulationsstimulierende Behandlung am aussichtsreichsten ist. Der nächste Schritt besteht in der Bestimmung, des am meisten wirksamen Gonadotropins, welches erlaubt, eine überdurchschnittliche Zahl von Follikeln innerhalb kurzer Zeit zur Ovulation zu bringen, ohne daß deswegen die Fruchtbarkeit herabgesetzt wird.

III. DIE BEFRUCHTUNG

A. Lebensdauer und Befruchtungsfähigkeit der Eizelle

1. In vivo

Zahlreiche Untersuchungen lassen erkennen, daß die Lebensdauer von Säugereizellen nach der Ovulation nur sehr kurz ist und daß die Befruchtungsfähigkeit rasch erlischt. Für die einzelnen Tierarten werden folgende Zeiten angegeben:

Kaninchen: 6 - 10 Stunden (47, 63, 67, 100, 166).

Ratte: ca. 10 Stunden (100).

Rind: durchschnittlich 6, höchstens 48 Stunden (8).

Bei diesen Angaben handelt es sich selbstverständlich um Näherungswerte, die ermittelt wurden durch Berücksichtigung von Brunstende, mutmaßlicher Ovula-

tion, Zeitpunkt der Paarung bzw. Insemination, ungefähre Lebensdauer der Spermien und Zahl der positiven Graviditäten. Da nun aber die Degeneration von Embryonen während der Frühträchtigkeit, besonders nach verspäteter Befruchtung häufig vorkommt (67, 144), mag die effektive Zeit der Befruchtungsfähigkeit etwas länger dauern.

Bei der Übertragung von Kaninchen-Oozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Ovulation auf Empfängertiere, welche gepaart worden waren, erhielt Chang (63) folgende Ergebnisse:

Stunden nach der Ovulation	befruchtete Eizellen		unbefr. Eizellen
	normal geteilt %	verzögerte Teilung %	
1 - 3	92 - 97	3 - 8	0
5	60	9	31
7	32	5	63
9	0	3	97

Daß die Eizellen des Kaninchens nur während kurzer Zeit befruchtungsfähig sind, geht auch aus der folgenden Tatsache hervor: Sobald die Oozyten die Eileiterampulle, den Ort der Befruchtung, verlassen, und in die distalen Eileiterabschnitte gelangen, werden sie mit einer Albuminhülle umgeben, die für die Spermien ein absolutes Hindernis darstellt.

2. Lebensdauer der Eizellen in vitro

Die kurze Lebensdauer der Oozyten im weiblichen Genitaltrakt stellt ein großes Hindernis dar für alle Versuche mit unbefruchteten Eizellen. Es ist deshalb anzustreben, Methoden zu entwickeln, die es gestatten, Oozyten, entsprechend den männlichen Keimzellen, in vitro längere Zeit befruchtungsfähig zu erhalten.

Chang (66, 67) gelang es, bei geeigneter Versuchsanordnung die Kaninchen-eizelle während 2-3 Tagen befruchtungsfähig zu erhalten (s. Abschnitt: Aufbewahrung unbefruchteter Eizellen, S. 44).

B. Morphologische Veränderungen der Oozyten

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß die unbefruchtete Eizelle eine große Bereitschaft zeigt zu morphologischen Veränderungen, die den ersten Entwicklungsstadien der befruchteten Eizelle täuschend ähnlich sein können. Die wenigen veröffentlichten Angaben über erfolgreiche in vitro Befruchtungen sowie die Berichte über positive Ergebnisse bei der Aufbewahrung und Züchtung von Eizellen in vitro müssen daher mit einer gewissen Skepsis aufgenommen werden.

1. Der Einfluß von Temperatur und Sauerstoff

Über die Aktivierung unbefruchteter Eizellen durch Kältebehandlung in vivo und in vitro liegen Arbeiten vor von Chang (68), Pincus u. Shapiro (154), Austin (18) und Austin u. Braden (16, 17).

Letztere berichten über die Kälteschockbehandlung:

- Kaninchenoozyten, einer Kältebehandlung ausgesetzt, bilden selten die zweite Polzelle, häufig jedoch ein oder zwei Kerne, die den Vorkernen gleichen.
- Auf 130 brünstige Ratten wurde 8-12 Stunden nach der Ovulation ein Kälteschock appliziert. Von 957 gewonnenen Eizellen zeigten 98 Kerne Neubildungen oder Teilungsstadien. Die zweite Polzelle kam regelmäßig zur Ausbildung.
- Da verschiedene Narkotika ebenfalls eine Aktivierung von Ratteneiern bewirken, wird vermutet, daß die Wirkung wenigstens zum Teil auf einer sich entwickelnden Gewebeanoxie beruhe (16).
- Durch intravitale Unterkühlung auf -6°C (Hamster) und 0°C (Ratten) unter Vermeiden von Narkose und chirurgischem Eingriff - was von den Tieren reaktionslos ertragen wurde - konnte der Einfluß von Hypothermie und Hypoxie getrennt studiert werden (18):

Tier	Behandlung	Anzahl Tiere	Eier total	davon aktiviert	
				Anzahl	in %
R	Hypoxie	8	109	39	36
R	Hypothermie	6	75	75	100
H	Hypoxie	5	42	0	0
H	Hypothermie	6	60	48	80

Diskussion der Resultate:

- Nach der Ovulation können 100 % der Ratteneier aktiviert werden durch intravitale Unterkühlung auf $0 - 1^{\circ} \text{C}$.
- 60 - 80 % der Hamster-Eizellen werden aktiviert bei Temperaturen zwischen $0 - 16^{\circ} \text{C}$.
- Hypoxie allein vermag 36 % der Ratteneier, aber keine Hamstereier zu aktivieren.

2. Die Aktivierung von Eizellen durch Sperma und Trypsin

Pincus (150, 151) untersuchte den Einfluß von Sperma und Trypsin und erhielt folgende Ergebnisse:

- Das Vermischen von frisch ovuliertem Kaninchen-Oozyten mit Kaninchen-sperma bewirkt eine Lockerung des Follikelzellverbandes und führt zur Abschnürung der zweiten Polzelle.
- Spermienfreie Samenflüssigkeit bewirkt ebenfalls die Dispersion von Follikelzellen, vermag aber die Formation der zweiten Polzelle nicht auszulösen.
- Die Dispersionswirkung von Sperma auf Follikelzellen beruht auf einem hitze-labilen Faktor und ist proportional der Spermienkonzentration.
- Trypsinlösungen (0,5 - 25 g/100 cc Ringer-Locke-Lösung) vermögen den Zellverband des Cumulus oophorus zu lockern. Multiple, den Polzellen zum Verwechseln ähnliche Bildungen bestehen aus cytoplasmatischen Abschnürungen, hervorgerufen durch die Wirkung des Trypsin.

3. Parthenogenese und Fragmentation

Champany (46) fand 1927 bei der Kultivierung eines Kaninchenovars in Kaninchenblutplasma, welchem Hühnerembryonalextrakt zugefügt worden war, einen Oozyten, der sich in 8 Blastomeren geteilt hatte, die deutlich unterschieden werden konnten. Diese Segmentierung konnte frühestens am 2. Tag nach dem Ansetzen der Kultur begonnen haben. Die Ursache dieser zweifellos provozierten Parthenogenese konnte nicht ermittelt werden.

Burkl u. Kellner (35) kultivierten Ovarien von Ratten. Bei der histologischen Untersuchung fanden sie in der Rindenzone Oozyten im Stadium der Reifeteilung oder mit Furchungen.

Chang fand bei der Aufbewahrung von unbefruchteten Eizellen bei Temperaturen von $0 - 16^{\circ} \text{C}$ eine Entwicklung bis zum 32 - Zell-Stadium (66, 67).

Weitere Untersuchungen über Wachstum, Reifung und Aktivierung von Kaninchenoozyten liegen vor von Pincus (150, 152) und Pincus u. Enzmann (149, 151, 154).

Über die Segmentation und Fragmentation unbefruchteter, nach der Kopulation mit vasektomierten Böcken gewonnener Eizellen berichtet Pincus (147): Von 213 unbefruchteten Eizellen zeigten 136 (= 63,8 %) in der Kultur eine Weiterentwicklung über das 1-Zell-Stadium hinaus.

Austin (11) fand unter 365 Eizellen von erwachsenen Ratten 119 mit Fragmentationserscheinungen, die z. T. eine sehr große Ähnlichkeit aufwiesen mit normalen, befruchteten und segmentierten Eizellen.

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei diesen Veränderungen tatsächlich um echte Parthenogenese handelt oder lediglich um eine degenerative Fragmentation. Viele der beobachteten Formen stellen zweifellos Degenerationserscheinungen dar. Vor allem ist Vorsicht geboten bei der Interpretation von 20- und mehr Zell-Stadien. So befand sich z. B. ein Ei 37 Stunden nach der Paarung des Kaninchens mit einem vasektomierten Bock im 1-Zell-Stadium. 6 Stunden später präsentierte es sich mit 32 Zellen. Dabei handelte es sich, wie Filmaufnahmen bewiesen, um eine komplexe Fragmentation, die den Eindruck von kleinen Blastomeren erweckte (147).

Eine große Zahl der jungen Eizellen teilt sich aber sicher echt parthenogenetisch. Da in vivo die Segmentation von Kaninchenoozyten praktisch nicht zu finden ist, muß sie durch die Kultur induziert worden sein. Nun gibt es aber im ganzen Ablauf der Eizellgewinnung und -kultur eine ganze Reihe von Faktoren, die als ursächliche Momente in Frage kommen können: Spülflüssigkeit - Temperaturunterschiede - Kulturmedium - Schockwirkung durch die Manipulation - Sauerstoffspannung - Hypertonisches Milieu. Welche Bedeutung den einzelnen Faktoren zuzumessen ist, bleibt noch abzuklären.

C. Kriterien der befruchteten Eizelle

Von den Angaben, die als "Beweise" für eine stattgefundene Befruchtung gemacht werden, seien erwähnt:

- Auffinden von Spermien, die den perivitellinen Raum oder das Cytoplasma erreicht haben.
- Ausstoßung der zweiten Polzelle.
- Retraktion des Cytoplasma und Erweiterung des perivitellinen Spaltes.
- Zellteilungsstadien.

- Bildung von Vorkeimen.
- usw.

Da nun aber auch die unbefruchtete Eizelle in vitro große Bereitschaft zeigt zu Segmentierung, Fragmentation und Parthenogenese und da die Interpretation von mikroskopischen Bildern nicht immer eindeutig ist, können eigentlich momentan als stichhaltig nur folgende Beweise angesehen werden:

- Nachweis des diploiden Chromosomensatzes im histologischen Präparat.
- Weiterentwicklung der Eizelle über das Morulastadium hinaus.

Austin (9, 13) empfiehlt zur Unterscheidung der degenerativen Fragmente von vitalen Blastomeren die Untersuchung im Phasenkontrastmikroskop.

D. Die künstliche Befruchtung

Es ist ein alter Traum der Biologen, Säugereizellen in vitro zu befruchten. Aber von den ungezählten Versuchen sind nur wenige positiv ausgefallen und selbst von diesen lassen einige noch Zweifel aufkommen. Einerseits kann die parthenogenetische Entwicklung nicht ausgeschlossen werden, andererseits hat noch keine cytologische Analyse eindeutig die verschiedenen Stadien der Befruchtung gezeigt.

1. Die Befruchtung in vivo

Umbough (178) versuchte beim Rind, die künstliche Befruchtung in vivo zu erreichen

1. durch Übertragen von Eizellen, denen Bullensperma zugefügt worden war.
2. durch Übertragen von Eizellen auf Kühe, die 19 Stunden vorher besamt worden waren.
3. durch Übertragung unbefruchteter Eizellen auf Kühe, denen man einige Stunden vorher Bullensperma in die Eileiter injiziert hatte.

Allen diesen Versuchen blieb der Erfolg versagt. Entsprechende Experimente wurden auch durch Dauzier u. a. (73) beim Kaninchen durchgeführt. Ebenfalls mit negativem Ergebnis. Hingegen gelang es Chang (69), durch die Übertragung von Follikeloozyten in die Eileiter besamter Kaninchen, befruchtete Eizellen zu erhalten.

2. Die Befruchtung in vitro

Befruchtungsversuche in vitro setzen die genaue Kenntnis der physiologischen Bedingungen voraus, welche unter natürlichen Verhältnissen bei der Befruchtung gegeben sind. Eine wichtige Erkenntnis zur Lösung dieses Problems lieferten die Untersuchungen von Austin (14) und Chang (61), die zeigen konnten, daß die Spermien vorgängig der Befruchtung im weiblichen Genitaltrakt eine Art Reifungsprozeß durchmachen müssen, um ihre volle Befruchtungskapazität zu erreichen.

Unter Beobachtung dieser Forderung gelang es Dauzier u. a. (73, 196), Kaninchen-Eizellen in vitro zu befruchten. Um jede parthenogenetische Aktivität auszuschließen, wurde streng bei Temperaturen zwischen 38 und 39° C laboriert. Das Sperma, gewonnen durch Spülen der Genitalwege von Kaninchen, die 12 Stunden vorher gepaart worden waren, wurde den Eizellen zugefügt, die in Locke-Lösung aufbewahrt wurden. Auf diese Weise gelang es, bei 19 von 121 Oozyten eine Segmentation zu erhalten. Cytologische Studien zeigten die Ausstoßung des zweiten Polkörperchens, das Eindringen des Spermiums in das Cytoplasma, die Bildung und Verschmelzung der Vorkerne. Serienschnitte von Oozyten, die zur Kontrolle unter gleichen Bedingungen aber ohne Sperma kultiviert worden waren, ließen jedes Anzeichen einer Aktivierung vermissen.

Ebenfalls mit Sperma, das während 10 Stunden aktiviert worden war, arbeitete Moricard (136). In einer mikrocinematographischen Studie gelang es ihm, folgende Stadien festzuhalten: Ankunft der Spermien in der Zona pellucida - Spermien im perivitellinen Raum - Retraktion des Cytoplasma - Bildung zweier heller Zonen, die den Vorkernen entsprechen dürften. Eine Segmentierung der Eizellen konnte allerdings nicht erreicht werden.

Moricard (135) untersuchte den Einfluß des Sauerstoffs auf die Befruchtung:

Unter aeroben Bedingungen, in einem Medium, in welchem Methylenblau oxydiert blieb, konnte ein Kontakt hergestellt werden zwischen Oozyten und Spermien. Das Eindringen der Spermien in die Zona pellucida konnte jedoch nicht erreicht werden.

Unter relativ anaeroben Bedingungen, in einem Medium, in welchem Methylenblau reduziert blieb, gelang es, bei 14 von 21 Oozyten die Penetration in die Zona pellucida nachzuweisen. In 5 Fällen erreichte ein Spermium sogar das Cytoplasma der Eizellen. Das zweite Polkörperchen wurde jedoch nicht gebildet und während einer 7 1/2-stündigen Kultur erfolgte auch keine Furchung der Eizellen.

Es scheint also, daß anaerobe Bedingungen die Erfolgchance für eine Befruchtung in vitro erhöhen. Diese Annahme wird bestätigt durch die Ergebnisse von

Venge (181), dem es sogar gelang, nach der Übertragung von in vitro befruchteten Eizellen auf Weibchen, die mit einem vasktomierten Bock gepaart worden waren, nach 30 Tagen drei Junge zu erhalten. Leider konnte die Abstammung der Jungen nicht eindeutig identifiziert werden, da sowohl Spender- und Empfängertier als auch der vasktomierte Bock derselben Rasse angehörten. Zudem muß berücksichtigt werden, daß vasktomierte Tiere noch während längerer Zeit fruchtbar sind.

Fridhandler u. a. (92) bestimmten den Sauerstoffbedarf von Kanincheneizellen und fanden: Der Sauerstoffbedarf einer unbefruchteten Eizelle beträgt 10^{-3} ml/Stunde. Bei der befruchteten Eizelle steigt der O_2 -Bedarf 80 Stunden nach der Ovulation stark an, eine Auswirkung der ausgeprägten morphologischen Veränderungen (frühes Blastocystenstadium).

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Boell u. Nicholas (28) bei Ratten.

IV. DIE GEWINNUNG VON EIZELLEN

Innerhalb des komplizierten Geschehens der Übertragung von Eizellen ist der Gewinnung von befruchteten und unbefruchteten Oozyten aus dem weiblichen Geschlechtsapparat eine große Bedeutung zuzumessen. Einfache technische Durchführung, hohe Ausbeute, Garantie der Erhaltung der Vitalität der Eizellen - Diese Forderungen müssen erfüllt sein, damit Eizellen erfolgreich übertragen werden können. Die Technik der Eigewinnung wird weitgehend bestimmt von den anatomischen Verhältnissen, weshalb die Besprechung nach Tierarten gesondert erfolgt.

A. Die Eigewinnung beim Kaninchen

1. Eialter und Eistadium

Um das Verständnis der Zusammenhänge zwischen Eistadium bzw. Eialter und Ort und Zeitpunkt der Eigewinnung zu erleichtern, dürfte es angebracht sein, zunächst das Schicksal befruchteter und unbefruchteter Eizellen in vivo zu verfolgen.

a) unbefruchtete Eizellen: (147)

Der Follikelsprung vollzieht sich beim Kaninchen 10 Stunden nach der Paarung. In einem Ovar können 1 - 8 Follikel ovulieren. Die Oozyten, von den Zellen des Cumulus oophorus umgeben, gelangen in den Eileiter, wo sie sich rasch zusammenballen. Die Separierung einzelner Eizellen beginnt 16 Stunden nach

der Kopulation. Nach 20 Stunden haben sich alle Follikelzellen gelöst und eine dünne Albuminschicht überzieht die Zona pellucida. Dieses Lösen der Follikelzellen vollzieht sich etwa innerhalb von 3 Stunden, so daß in der Spülflüssigkeit zwischen der 16. und 20. Stunde nach der Kopulation alle Übergänge zu finden sind von der nackten Eizelle bis zum Ei, das noch völlig im Cumulus oophorus eingebettet liegt. Nach 24 Stunden ist die Albuminschicht von beträchtlicher Dicke. Sie nimmt während der Eileiterwanderung weiter zu, so daß sie schließlich dicker wird als das Ei selbst. Dadurch verliert die Zona pellucida ihre klare Durchsichtigkeit. Die meisten Tubeneizellen weisen einen, u.U. sogar zwei oder mehrere Polkörper auf. Nach 72-96 Stunden erreichen die unbefruchteten Eizellen den Uterus, wo sie rasch zerfallen und nur zum kleinsten Teil noch durch Spülung gefunden werden können. Das Zytoplasma solcher Eizellen zeigt starke Degenerationserscheinungen.

b. Befruchtete Eizellen: (55, 147)

11 Stunden nach fertiler Kopulation werden die Eizellen ebenfalls in den Cumulusmassen eingebettet gefunden; v. a. bei großen Rassen, bei denen die Ovulation um ein Geringeres später eintritt. Nach 11 Stunden und 30 Minuten sind die meisten Eizellen von den Cumulusmassen befreit, aber noch umgeben von den Zellen der Corona radiata. 15 Stunden nach der Paarung sind die Eizellen vollkommen frei von adhärierenden Follikelzellen. Eine dünne Albuminschicht umhüllt die Eier, welche denen gleichen, die 16 - 20 Stunden nach steriler Kopulation ausgewaschen werden. In der Zona pellucida können 10 bis 100 Spermien nachgewiesen werden. Nach 15-20 Stunden sind alle im 1-Zell-Stadium. Die zweite Polzelle wird 17 - 18 1/2 Stunden nach der Paarung ausgestoßen. Nach 21 Stunden beginnen sich die ersten Eier zu teilen. Nach 24 Stunden befinden sich alle im 2-Zell-Stadium. 48 Stunden nach der Kopulation findet man die Eizellen im Stadium der Morula, von einem ziemlich dicken Albuminmantel umhüllt. Nach 3-4 Tagen erreichen die Eier als Blastocysten den Uterus. 6 Tage nach der Paarung können sie noch als 3-4 mm große Blastocysten mit einer gut geformten Keimscheibe aus dem Uterus entnommen werden. Nach 7 Tagen beginnt die Nidation.

2. Die Eigewinnung aus Follikeln

Um die Befruchtungsfähigkeit von Follikel-Oozyten zu überprüfen, führte Chang (69) die Eigewinnung am Follikel aus. Das technische Vorgehen ist im Kapitel VI. D beschrieben.

3. Die Eigewinnung aus exzidierten Organen

Die Eigewinnung aus dem herausgeschnittenen Geschlechtsapparat, entweder nach Tötung des Tieres oder nach operativer Resektion, ist am einfachsten und bereitet technisch keine Schwierigkeiten. Diese Methode bildete lange Zeit die einzige Möglichkeit, Eizellen zu gewinnen. Sie hat den großen Nachteil, daß die Tiere entweder geopfert werden müssen oder für weitere Transplantationsversuche unbrauchbar werden. Die Entwicklung einer Technik, die es gestattet, am lebenden Tier in situ Eizellen herauszuspülen, bedeutete daher einen großen Fortschritt.

4. Die Eigewinnung am lebenden Tier

Die Eigewinnung in situ gestattet, sowohl Spender- als auch Empfängertier wiederholt zu Transplantationsversuchen zu gebrauchen. Die Technik, die sich als verhältnismäßig einfach durchführbar und erfolgreich erwiesen hat, sei kurz skizziert. Sie basiert auf Angaben von Avis u. Sawin (21), Chang (63), Venge (180) sowie auf eigenen Erfahrungen.

a) Schmerzausschaltung

Sämtliche chirurgischen Eingriffe werden in allgemeiner Betäubung ausgeführt. Als Narkotika finden Verwendung:

Äther-Inhalation (10, 77)

Nembutal (69, 77)

Thiogenal (eigene Versuche)

Ob intraperitoneal verabreichte Medikamente Vitalität und Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigen, ist nicht bekannt. Auf die Wirkung von Narkotika, unbefruchtete Eizellen zu aktivieren, wurde bereits hingewiesen. (s. S. 28). Eine Schädigung ist durchaus möglich, da Eileiter und Ovar unmittelbar der Bauchwand anliegen. Es wäre wünschbar, daß entsprechende Untersuchungen über dieses Problem Klarheit schaffen würden.

b) Laparatomie

Die Laparatomie wird beidseitig ausgeführt. In der Flanke wird ein etwa 5 cm langer, kaudoventral gerichteter Schnitt durch die Bauchdecke angebracht. Blutungen können leicht durch Klemmen gestillt werden. Nach dem Durchtrennen des Bauchfelles tritt das reichlich vorhandene, subperitoneale Fettgewebe zutage. In ihm verläuft der 3-5 cm lange, blaßrote, stark geschlängelte Eileiter, der leicht erkennbar ist. Um jeden mechanischen Insult am Geschlechtsapparat zu vermeiden, wird das Fettgewebe mit stumpfen Pinzetten erfaßt und

Eileiter und Uterushorn sorgfältig aus der Bauchhöhle entwickelt. Dabei wird auch das Ovar sichtbar, dessen Funktionsstadium leicht beurteilt werden kann.

c) Die Gewinnung von Eizellen aus dem Eileiter

Etwa 2 1/2 cm distal von der Eileitereinmündung wird eine kurze Inzision am Uterushorn angebracht; gerade groß genug, daß ein kurzes Stück einer Glas-kanüle oder eines Gummischläuchleins eingeführt werden kann. Dieses wird nun mit einer Ligatur oder durch einen Gehilfen fixiert. Ein Harnkatheter oder eine stumpfe Kanüle (1 mm Querschnitt) wird durch das ostium abdominale in den Eileiter eingeführt und durch eine Ligatur festgehalten. Mit einer isotonischen, sterilen Salzlösung (körperwarm) kann nun der Eileiter durchgespült werden. Etwa 20 Tropfen werden in einem Uhrglas aufgefangen. Eine Naht der Uteruswunde ist nicht erforderlich. Die Bauchdecke wird mit Catgut, die äußere Haut mit Seide verschlossen.

Chang (63) spülte die Eileiter in ascendierender Richtung. Da er zum Auffangen der Eizellen auch eine Pipette in den Eileitertrichter einführen muß, und da andererseits das Lumen des Eileiters gegen das Ovar zu immer weiter, der Druck der Spülflüssigkeit also immer kleiner wird, dürfte diese Methode keine nennenswerten Vorteile aufweisen.

d) Die Gewinnung von Eizellen aus dem Uterus

Durch eine kleine Inzision am vaginalen Ende des Uterushornes wird ein gebogenes Glasröhrchen von etwa 10 cm Länge und 3 mm Durchmesser in das Uteruslumen eingeführt und mit zwei Fingern in der Lage erhalten. Mit einer Spritze, deren Kanüle unmittelbar nach der Eileitereinmündung eingestochen wird, werden etwa 5 cc einer isotonischen Salzlösung injiziert und in einem Uhrglas aufgefangen.

Diese Methode eignet sich für Blastocysten, die 4-5 Tage nach der Kopulation des Kaninchens den Uterus erreichen und einen Durchmesser von 1-2 mm aufweisen.

5. Resultate

Der Hundertsatz gewonnener Eizellen - in Bezug auf die Corpora lutea - ist sehr hoch und schwankt zwischen 75 und 100 %. Über die Befruchtungsquoten finden sich Angaben in den Abschnitten Superovulation und Transplantation.

Avis u. a. (21) geben an, daß nach der Transplantation der in situ gewonnenen Eizellen sich 81 % weiter entwickelten.

B. Die Eigewinnung beim Rind

1. Die Entwicklungsstadien der Eizelle

Die Eizelle des Rindes ist nur vom Oolemm (Zona pellucida) umgeben. Im Verlauf der Eileiterwanderung erfolgt keine Anlagerung von Albumin, wie dies beim Kaninchen der Fall ist. Die verschiedenen Entwicklungsstadien stimmen im Wesentlichen mit denen beim Kaninchen überein (s. S. 34).

Pincus (156) untersuchte die Entwicklung von befruchteten Rinder-Eizellen in vivo und erhielt folgende Resultate:

Tage nach der ovulationsaus- lösenden Injekt.	Eizellen			
	Fundort		Eileiter in %	geteilt %
	Eileiter	Uterus		
2	98	8	92,5	1
3	177	21	89,4	42,4
5	2	10	16,7	100
6	0	32	0	100

Da die Ovulation 26 und mehr Stunden nach der intravenösen Injektion von Gonadotropinen auftritt, kann aus der Tabelle ersehen werden, daß sich die ersten Zellteilungen 1-3 Tage später einstellen. Da einige Eizellen den Uterus schon am 2. Tag erreicht haben, muß angenommen werden, daß durch die medikamentell ausgelöste Superovulation die Eileiterwanderung beschleunigt worden ist (s. auch S. 10).

3 1/2 bis 4 1/2 Tage nach der Brunst erreichen die Eizellen die Spitze des Uterushornes. 12 - 24 Stunden später liegen sie irgendwo frei im Uterushorn (70, 121).

8-9 Tage nach der Ovulation differenzieren sich innerhalb der Zona pellucida die innere Zellmasse (= Zentralknoten = Embryoblast, Blastocoele und Trophoblast. In diesem Stadium haben die Blastocysten (vesicula blastodermica) noch die Größe des unbefruchteten Eies. Die Differenzierung des primitiven Entoderms und der primitiven Keimplatte geschieht vom 11. -12. Tag an. In dieser Phase der Entwicklung verschwindet die Zona pellucida (65).

2. Die Eigewinnung am toten Rind

Da der Geschlechtsapparat des weiblichen Rindes auch operativ nicht ohne erhebliche Schwierigkeiten zugänglich ist, wurden die meisten Versuche zur Eigewinnung an frisch geschlachteten Rindern unternommen (98, 156, 178, 192, 195, 197). Das technische Vorgehen wird im zweiten Teil: Eigene Untersuchungen, näher erläutert.

3. Die Eigewinnung in situ

a) auf chirurgischem Wege

Die einzige diesbezügliche Arbeit stammt von Umbough (178). 26 Stunden nach der intravenösen, ovulationsauslösenden Injektion wurde in der Flanke oder in der Medianen die Laparatomie ausgeführt. Die Eizellen wurden durch Aspirieren reifer Follikel gewonnen. Die technischen Schwierigkeiten waren sehr groß, so daß von durchschnittlich 20 Follikeln es nur in 6 Fällen gelang, die Eizelle zu isolieren. Befruchtungsversuche mit diesen Eizellen in vivo und in vitro verliefen negativ (s. S. 31).

b) Eigewinnung beim Rind auf unblutige Weise

Der optimale Zeitpunkt für die Eigewinnung auf unblutige Weise liegt zwischen dem 4. und 7. Tag nach der Brunst. Die Eizelle befindet sich dann bereits im Uterus, hat sich aber noch nicht eingenistet. Obwohl die Laparatomie beim Rind heute ohne großes Risiko durchgeführt werden kann, hat doch nur eine unblutige Methode der Eigewinnung Aussicht, praktische Bedeutung zu erlangen. Die ersten Angaben über erfolgreiche Versuche mittels Rücklaufkathetern stammen von Umbough (178) und Rowson und Dowling (160).

Dracy u. Petersen (80) versuchten, die Ovarien leichter zugänglich zu machen durch Transplantation in die Nackengegend, durch Translokation unter die Haut (in der Flanke) oder in die Vagina. Alle diese Versuche mißlang. Entweder war das Ovar nicht lebensfähig oder dann war es unmöglich, die Ovulation auszulösen. Auch Versuche, die Eizellen in einem am 3. Tag nach der Ovulation eingeführten und 48 Stunden liegen gelassenen Gummikatheter aufzufangen, scheiterten an unüberwindbaren Schwierigkeiten in der technischen Durchführung.

In weiteren Versuchen (79, 81) fand ein Zwei-weg-Katheter Verwendung. Ca. 1 Liter Spülflüssigkeit wurde mit einer Fahrradpumpe über eine Saugflasche durch einen in das Uterushorn eingeführten Katheter eingepumpt und durch eine Kanüle abfließen gelassen. Die Spülflüssigkeit wurde in französischen Scheide-

trichtern aufgefangen. Nach 15 - 20 Minuten erfolgte die Untersuchung des Sedimentes bei 25-facher Vergrößerung.

Ergebnisse:

In einer Serie von 19 Versuchen wurden 9mal befruchtete Eizellen gefunden (81).

12 Kühe wurden 37mal gespült. Dabei konnten 41 Eizellen isoliert werden (80). Die Eizellen befanden sich alle im Blastocystenstadium.

C. Die Eigewinnung beim Schaf

Hunter u. a. (115) berichteten über eine Methode der Eigewinnung, die es gestattete, 57,8 % der ovulierten Eizellen zu isolieren:

Die Schafe erhielten 15 - 20 cc Nembutal i. v. als Basisnarkose. Vor dem Euter wurde in der Medianen ein 7-8 cm langer Schnitt durch die Bauchdecken angebracht und Uterus und Ovarien freigelegt.

Die Durchspülung der Eileiter erfolgte in ascendierender Richtung. Mit einer Injektionskanüle wurde die Spülflüssigkeit an der Eileitereinmündung injiziert. Der Abfluß erfolgte durch ein Glasröhrchen von 2 mm Durchmesser, welches etwa 3 cm durch die Fimbria in den Eileiter eingeführt wurde.

Sollten nur die Uterushörner gespült werden, so wurde die Kanüle ebenfalls an der Spitze des Uterushornes angesetzt. Der Abfluß erfolgte aber durch eine Kanüle von 1,4 mm Durchmesser, die etwa 6 cm von der Hornspitze entfernt in das Uteruslumen eingeführt worden war. (Unter Kompression der kaudal davon gelegenen Partie mit den Fingern.) Zur Spülung wurden 2 cc körperwarmes, homologes Blutserum oder sterilisierte Ringerlösung verwendet.

Diese Methode wurde auch durch Averill u. a. (19, 20) mit gutem Erfolg angewendet.

D. Die Eigewinnung bei Maus und Ratte

Über die Eizellgewinnung bei Ratten berichteten Simpson u. a. (169). Nach dem Durchspülen der Eileiter, ca. 24 Stunden nach der Paarung, konnten sie pro Tier 7-8 Eizellen isolieren.

Bei Mäusen liegen über die Eigewinnung Berichte vor von Beatty (23) und Whitten (189).

E. Diskussion

Für die Beurteilung der bei der Eigewinnung erzielten Resultate kommt es weniger auf die Zahl der gewonnenen Eizellen an, als vielmehr darauf, ob diese Eizellen trotz des Eingriffs und der Behandlung weiter entwicklungsfähig sind. Beweisend hierfür sind gegenwärtig einzig Transplantationsversuche. Es wäre wünschenswert, wenn Methoden entwickelt würden, die es gestatten, auf einfache Weise die Lebensfähigkeit von Eizellen nachzuweisen, sei es unter dem Mikroskop, durch Vitalfärbungen oder durch andere, mikrochemische und mikrobiologische Reaktionen.

Angaben über die prozentuale Ausbeute bei der Gewinnung von Eizellen sowie über Fruchtbarkeitsergebnisse finden sich in den Kapiteln Superovulation und Transplantation.

V. AUFBEWAHRUNG UND KULTUR VON EIZELLEN

Das Arbeiten mit Eizellen setzt automatisch die Verwendung eines Mediums voraus, sei es zur Gewinnung, Aufbewahrung, Kultur oder Transplantation. Von der Beschaffenheit dieses Mediums hängt es ab, wie weit die Integrität einer Eizelle während der Transplantation erhalten bleibt. Genaueste Kenntnis der optimalen Lebensbedingungen einer Eizelle sind deshalb notwendig. Die verschiedenen Faktoren, welche es zu berücksichtigen gilt, seien stichwortartig aufgezählt: Temperatur - stoffliche Zusammensetzung des Medium - respiratorischer Quotient - pH - osmotischer Druck - Stoffwechsel - ovicide Faktoren - tierartliche Unterschiede.

A. Faktoren, welche die Vitalität kultivierter Eizellen beeinflussen

1. Medium

Bei den bisher erfolgreichen Transplantations- und Zuchtungsversuchen haben folgende Medien Verwendung gefunden:

a) Spül- und Transportflüssigkeiten:

- Kan.:
- Pannet-Compton-Lösung (147, 152)
 - homologes Serum (49, 152)
 - Locke-Lösung (73)
 - Kan.-Serum + physiolog. NaCl aa. (52, 69, 153, 183)
 - physiolog. NaCl (24, 128, 168, 183)

- phosphatgepufferte Ringer-Dale-Lösung (pH 6,5 - 7) mit 0,2 % Glucose + Kan. Serum aa. (63)
- homolog. Serum + Ringerlösung aa. (10)
- Tyrode-Lösung (152)
- isoton. Salzlösung + 5 % Dextrose (21)
- Ringerlösung (179)
- Krebs-Lösung (25)

- Rind:
- homolog. Serum (156, 195)
 - physiolog. NaCl (79, 193)
 - Tyrodelösung (120)

- Schaf:
- Physiolog. NaCl (184)
 - Tyrodelösung (184)
 - Augenkammerflüssigkeit (184)
 - Lockelösung (43)
 - homolog. Serum (19, 115)
 - Ringerlösung (115)

- Maus:
- Pannet-Compton-Lösung (23)
 - phosphatgepufferte KCl-NaCl-MgCl₂-Lösung mit Zusatz von 108 mg% Glucose und 8-9 ml Eiweiß (104).

- Ratte:
- Locke-Lösung (28)
 - Krebs-Henseleit-Ringer-Lösung (28)
 - homologes Serum (28)
 - phosphatgepufferte, physiolog. NaCl-Lösung (28)

b) Kulturmedien

- Kan. :
- Kan. Blut-Plasma + Hühnerembryonalextrakt (147, 46)
 - homologes Serum (47, 73, 122, 152)
 - Ringer-Locke-Lösung (150)
 - Kan. Serum + physiologische NaCl aa. (52, 69)
 - Kan. Serum + Glycerol (173)
 - Locke-Lösung (73)

- Rind:
- homologes Blutserum (156)

- Maus:
- Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (pH 7,4) mit 10 ~~g~~ / ml Penicillin u. Streptomycin + 1 % Eiweiß oder 0,1 - 0,4 % kristallines, bovines Albumin (189)
 - Phosphatgepufferte KCl-NaCl-MgCl₂-Lösung mit 3-4 ml Eiweiß (pH 7,2 - 7,4). Vor Gebrauch zentrifugiert (104).

- Ratte:
- s. Spülflüssigkeiten.

Wie aus dieser Zusammenstellung ersichtlich ist, wurden die verschiedensten isotonischen Salzlösungen mit Erfolg zur Kultur und Übertragung von Eizellen verwendet. Welche Art der stofflichen Zusammensetzung als optimal zu betrachten ist, kann nicht beurteilt werden. Am meisten Verwendung fanden homologe Sera, allein oder zusammen mit physiologischer Kochsalzlösung.

Pincus (152) schreibt, daß zur Spülung von Kaninchen-Eileitern das Serum den Salzlösungen überlegen sei.

Warwick u. a. (184) geben an, daß sie mit physiologischer Kochsalz- und mit Tyrodelösung mäßige, mit Augenkammerflüssigkeit aber wesentlich bessere Erfolge erzielt haben.

Bezüglich der Verwendung von Seren sei noch auf die Arbeit von Chang (51) hingewiesen. Er konnte nachweisen, daß im Serum von Mensch, Schaf, Rind, Ziege, Geflügel ein für Kanincheneizellen ovicider Faktor vorhanden ist, der in obiger Reihenfolge zunimmt an Konzentration und Wirksamkeit. Das Serum von Pferd, Kaninchen, Hund, Ratte und Schwein enthält diesen Faktor nicht.

2. Temperatur

Untersuchungen an Ratteneiern ergaben, daß ovarielles Gewebe für längere Zeit bis auf -190°C abgekühlt werden kann. Anschließende Transplantation auf ovariectomierte Tiere ergab schon nach 6 Tagen Follikelreifung. Histolog. Studien zeigten jedoch, daß die Oozyten der Graaf'schen Follikel schwer geschädigt waren. Die meisten Eizellen wurden während des Gefrier- und Auftauprozesses irreversibel geschädigt (145).

Smith (172, 173) prüfte die Entwicklungsfähigkeit von befruchteten Kaninchen-eiern, nachdem sie bei verschiedenen Temperaturen von 20°C bis -190°C verschieden lang aufbewahrt worden waren. Als Medium diente Kaninchenserum mit Glycerolzusatz.

Ergebnisse:

- Zusatz von 15 % Glycerol führt bei Kaninchenoozyten zu irreversiblen Schrumpfungen zufolge des osmotischen Mißverhältnisses.
- Steigende Konzentrationen von 2,5 - 7,5 % Glycerol bewirkten Veränderungen, die innerhalb einer Stunde bei 20°C reversibel blieben.
- Bei 37° und 10-minütigem Verweilen in steigenden Konzentrationen von 2,5 - 3,5 - 5 - 7,5 - 10 % zeigten die Eizellen keine, bei weiterer Steigerung auf 15 % nur leichte Schrumpfung, die sich rasch wieder ausglich. Nach 18 Stunden degenerierten auch diese Eizellen.

- Eizellen, bei 37° C mit steigenden Glycerolkonzentrationen behandelt, wurden 30 Minuten bei 37°, 60 Minuten bei 20° aufbewahrt und nachher auf 0-5° abgekühlt. Nach dem Auftauen auf 37° wurde das Glycerol entzogen und die Eizellen kultiviert. 66 - 90 % der so behandelten Eizellen teilten sich in der Kultur weiter.
- Bei rascher Abkühlung innerhalb von 7 Minuten von 20° auf 0° blieben 80 - 100 % teilungsfähig.
- Unterkühlung auf -17° bis -20° ergab 20 % teilungsfähige Zellen.

Die Aufbewahrung bei -15° während 3-4 Tagen lieferte gute, nach 4-7 Tagen geringe Teilungserfolge. Nach 14 Tagen Aufbewahrungszeit hatten alle Eizellen die Fähigkeit zur weiteren Teilung verloren. Verschiedene Methoden zur Unterkühlung auf -79°, -160° und -190° C ergaben negative Resultate.

Chang (47) lagerte befruchtete Kaninchenoozyten im 2-Zell-Stadium bei verschiedenen Temperaturen und variierender Dauer und kultivierte sie anschließend während 24 Stunden bei 37° C, um festzustellen, wie weit die Teilungsfähigkeit erhalten geblieben war.

Temp. ° C.	% normale Teilung nach einer Aufbewahrungszeit von (Stunden)				
	24	72	120	144	168
0	63,4	48,1	0		
10	82,2	58,8	36,5	23,6	0
25	37,2	0			

Aus der Übersicht geht hervor, daß die optimale Temperatur zur Aufbewahrung von Kaninchen-Eizellen 10° C beträgt.

Übertragungsversuche mit befruchteten, bei 10° C gelagerten Eizellen waren jedoch nur zum Teil erfolgreich. Das Ausbleiben der Trächtigkeit zeigt, daß Eizellen, welche sich in der Kultur normal teilen, nicht notwendigerweise auch einer normalen Weiterentwicklung fähig sind.

6-Tage-Blastocysten, die während 24 Stunden bei 10° C aufbewahrt worden waren, führten nach der Transplantation bei 50 % zur Ausbildung einer Gravidität (52).

Pincus (156) kultivierte befruchtete Rinder-Eizellen in homologem Serum und fand, daß sich bei Temperaturen von $0-10^{\circ}\text{C}$ während 48 Stunden durchschnittlich 0,4 bis 3 neue Zellen bilden.

Rowson (163) konnte Schaf-Eier bei 10°C während 72 Stunden aufbewahren, ohne daß die Vitalität beeinträchtigt wurde. Transplantationsversuche mit solchen Eizellen waren erfolgreich.

3. Das Alter der Eizelle

Aus den Untersuchungen von Chang (52) geht hervor, daß sich nicht alle Eistadien gleich gut eignen zur Aufbewahrung. Kanincheneizellen verschiedenen Alters wurden während 24 Stunden bei 10°C aufbewahrt und hierauf transplantiert. Die 4-Tage-Blastocysten schienen besonders empfindlich zu sein. Bei einer Aufbewahrung von 15 Minuten bei 30° schrumpften fast alle; 6-Tage-Blastocysten unter gleichen Bedingungen jedoch keine.

Die Entwicklung von Eizellen des Kaninchens nach 24-stündiger Aufbewahrung bei 10°C : (n. Chang (52))

Eialter Tage	Ort der		% Entwicklung aller Trans- plantationen	
	Gewinnung	Transplantation	gelagert	direkt über- tragen
1	Tube	Tube	37	54
3	Tube od. Uterus	Uterus	37	31
4	Uterus	Uterus	19	43
6	Uterus	Uterus	43	42

Im übrigen geht aus der Tabelle hervor, daß die 24-stündige Aufbewahrung, im Vergleich zu den Direktübertragungen, ohne großen Einfluß gewesen ist.

4. Die Aufbewahrung unbefruchteter Eizellen

Über die Aufbewahrung unbefruchteter Eizellen von Kaninchen berichtet Chang (63, 67, 66):

Bei 10° bis 0°C kann die unbefruchtete Eizelle 48-72 Stunden aufbewahrt werden, ohne die Fähigkeit zur Befruchtung zu verlieren. Die optimale Temperatur ist 10°C .

Unbefruchtete Eizellen, aufbewahrt bei $0-10^{\circ}\text{C}$ zeigen oft Zellteilungen bis zum 32-Zell-Stadium (Parthenogenetische Aktivität) (67, 152).

Während das Kaninchenei im Eileiter nur etwa 8 Stunden lebensfähig bleibt, ist es möglich, in vitro die Befruchtungsfähigkeit während 2-3 Tagen zu erhalten.

5. Die Aufbewahrungsdauer

Wie aus den Tabellen Seite 43 und 44 hervorgeht, bleibt die Entwicklungsfähigkeit einer Eizelle bei einer 24-stündigen Lagerung bei 10°C praktisch unverändert. Schon nach 72 Stunden jedoch beträgt sie nur noch 58 %. Sie nimmt mit der Verlängerung der Aufbewahrungsdauer weiterhin ab und nach 7 Tagen erlischt sie ganz.

Hunter u. a. (115) erhielten von 8 Transplantationsversuchen mit Schaf-Eizellen, die länger als 45 Minuten in vitro aufbewahrt worden waren, nur eine einzige positive Übertragung.

Averill (20) konnte nach langsamer Abkühlung Schaf-Eizellen während 115 Minuten bei 30°C zu 100 % entwicklungsfähig erhalten. Bei sinkenden Temperaturen und verlängerter Aufbewahrungszeit sank die Fruchtbarkeitsquote rasch.

Versuche, Schafeier während längerer Zeit bei Temperaturen zwischen 0° und 8°C aufzubewahren, ergaben folgende Resultate:

Lagerung in Std.	Eizellen		
	transplantiert	weiterentwickelt	
		Anzahl	in %
9	12	9	75
24	15	7	47
48	4	1	25
72	9	2	22

6. Übrige Faktoren

Nicholas (140) fand, daß Ratten-Embryonen sich in einem bewegten Milieu besser entwickelten als in einem ruhenden. Er berichtet über die Wirkung von Temperatur, pH und Medium auf die in vitro Entwicklung. Seine Untersuchungen

beziehen sich allerdings auf ältere Embryonen, wie sie zur Transplantation nicht mehr verwendet werden können.

Messungen über den respiratorischen Stoffwechsel von Säugereizellen liegen vor von Boell u. Nicholas (28), Fridhandler (92) und Smith u. Kleiber (171), s.S. 33.

Aus der Arbeit von Boell u. Nicholas (28) über die Wirkung verschiedener Faktoren bei der Kultivierung von Ratteneizellen seien folgende Ergebnisse zitiert:

a) Konzentration des Mediums

- 0,6 % NaCl: Nach einer halben Stunde Schwellung und Zytolyse der Eizellen.
- 0,8 % NaCl: Die Vitalität blieb während mindestens 6 Stunden erhalten.
- 1,0 % NaCl: Die Lebensfähigkeit blieb länger erhalten als bei hypotonischen Lösungen. Die Oozyten zeigten aber nach 6 Stunden Schrumpfungerscheinungen.

b) Zusammensetzung des Mediums

Locke-Lösung, Krebs-Henseleit-Ringer-Lösung, verdünnte Seren und Zusätze von 0,2 % Glucose ergaben keine besseren Ergebnisse als die Verwendung einer phosphatgepufferten, 0,8 % NaCl-Lösung vom pH 7,4.

c) Sauerstoffbedarf

Der O_2 -Bedarf einer befruchteten und sich teilenden Eizelle beträgt 0,7 - 1,1 $\cdot 10^{-3}$ ml pro Stunde.

B. Die Kultur von Eizellen in vivo

Das Fehlen einer zuverlässigen Methode zur Kultur von Schafeizellen gab Veranlassung zur folgenden Untersuchung:

Averill u. a. (19, 20) übertrugen befruchtete Schafeier im 2-, 4-, 8- und 12-Zell-Stadium in die Eileiter von Kaninchen, die 2 - 114 Stunden vorher mit einem vasektomierten Bock gepaart worden waren, um sie dort zur Weiterentwicklung zu bringen. Die Kaninchen wurden 4-5 Tage später getötet. Alle Kanincheneier waren ungeteilt. Die Schafeier hatten sich bis zum Stadium der Morula bzw. der 6-9 - Tage - Blastocysten weiter entwickelt. Nach dem 10. Tag jedoch unterblieb die Ruptur der Zona pellucida und die Blastocysten fielen der Degeneration anheim. Zwei Blastocysten wurden rückübertragen auf

Schafe. 16 Tage später konnten normalentwickelte Embryonen gefunden werden.

VI. DIE EIÜBERTRAGUNG IM ENGEREN SINN

Ein Hauptanliegen jeder züchterischen Tätigkeit liegt im Bestreben, hervorragenden Individuen eine intensive Vermehrung zu sichern. Beim männlichen Tier wird diese Forderung erfüllt durch die künstliche Besamung. Dabei werden haploide Geschlechtszellen auf möglichst viele weibliche Tiere übertragen. Beim weiblichen Tier besteht die entsprechende Maßnahme in der Transplantation von Eizellen. Da aber die Befruchtungsfähigkeit von Oozyten zeitlich sehr begrenzt ist (s. S. 26) und weil es beim Großtier schwierig ist, auf einfache Weise Eizellen aus dem Eileiter zu gewinnen, kann wohl nur das Übertragen weiblicher Keimzellen eine größere praktische Bedeutung erlangen.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde hingewiesen auf Wesen, Bedeutung und Beeinflussungsmöglichkeit der verschiedenen Phasen, die der Übertragung von Eizellen vorangehen. In diesem Kapitel werden nun noch diejenigen Faktoren besprochen, die mit der Eizelltransplantation unmittelbar in Zusammenhang stehen.

A. Die Gleichschaltung des Geschlechtszyklus

Chang (54) stellte Untersuchungen an über den Einfluß des Ovulationstermines des Empfängertieres auf die Entwicklung transplantierte Eizellen.

Aus der Zusammenstellung auf Seite 48 geht klar hervor, daß der Hundertsatz erfolgreicher Transplantationen um so größer ist, je besser das Zyklusstadium des Empfängertieres mit dem Furchungsstadium bzw. Alter der Eizelle übereinstimmt. Zwei Tage vor und zwei Tage nach dem Korrespondieren des lutealen Stadiums von Spender- und Empfängertier versagt die Übertragung der Eizellen.

Zu gleichen Ergebnissen gelangten Nicholas (139) bei Ratten und Fekete u. Little (88) bei Mäusen.

Da es vorläufig nicht möglich ist, Eizellen in vitro während längerer Zeit zu kultivieren, kann diese Forderung nur erfüllt werden durch künstliche Synchronisierung des Sexualzyklus von Spender- und Empfängertier.

Tage zw. Ovulation des Spender- und Ovul. des Empfängertieres	% Eizellen, die sich bei den gravid gewordenen Tieren weiter entwickelten bei einem Eialter von (Tagen)			
	1	2	4	6
- 5	0			
- 2	0			
- 1	21,6			
0	38,0	0	0	
1	62,2	0	0	
2	19,2	29,3	25,0	
3	0	28,7	57,5	0
4	0	0	58,7	21,9
6			0	47,7
8			0	17,4
9 u. mehr				0

Der Geschlechtszyklus wird im wesentlichen bestimmt durch die Aktivität der Ovarien, die ihrerseits gesteuert wird durch übergeordnete, neurohormonale Reize. Das ganze komplexe Geschehen manifestiert sich am Eierstock als Follikelwachstum, Ovulation und Gelbkörperbildung. Jede Behandlung, die uns gestattet, eine dieser Komponenten zu beeinflussen, ist geeignet, den Geschlechtszyklus zweier weiblicher Tiere zur Übereinstimmung zu bringen.

Die größte Bedeutung kommt der Möglichkeit zu, den Follikelsprung künstlich auszulösen. Alle unter dem Kapitel Ovulation besprochenen Maßnahmen können daher zur Synchronisierung des Sexualzyklus angewandt werden. Auf einzelne tierartige Besonderheiten sei kurz hingewiesen.

1. Kaninchen

Beim Kaninchen wird die Ovulation natürlicherweise durch die Kopulation provoziert. Die meisten Untersucher machen sich diese sexualphysiologische Besonderheit zunutze, indem sie das Empfängertier mit einem vasktomierten Bock paaren. Die Ovulation tritt normalerweise 10 Stunden später ein.

Von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung von Experimenten ist der Nachweis der Sterilität des vasktomierten Tieres durch Untersuchungen des Ejakulates, das entweder mit der künstlichen Scheide (126) oder aus der Vagina einer gedeckten Häsın gewonnen wird. Es ist erwiesen, daß im Ejakulat von kastrierten Tieren noch wochenlang befruchtungsfähiges Sperma, aus Samenblase bzw. Samenleiterampulle, vorhanden ist. Ob dieser Tatsache bisher bei allen Versuchsanordnungen genügend Beachtung geschenkt wurde, bleibe dahingestellt.

Diese, durch die Kopulation ausgelöste Ovulation ist jedoch nicht mit Sicherheit zu erreichen. Pincus (153) schreibt, daß eine ovulationsauslösende Injektion nicht durch die Paarung ersetzt werden könne. Eigene Untersuchungen bestätigen diese Tatsache. Es scheint, daß auch der Geschlechtszyklus der Kaninchen einer gewissen Periodizität unterworfen ist.

In den meisten Transplantationsversuchen wurde daher die Gleichschaltung des Zyklus durch eine intravenöse Injektion von Luteinisierungshormon bzw. Hypophysenextrakten erreicht.

2. Gleichschaltung des Geschlechtszyklus beim Rind

Beim Rind kann der Funktionszustand der Ovarien durch rektale Exploration festgestellt werden. Da zudem die Möglichkeit besteht, auf einfache Weise einen Gelbkörper zu entfernen, kann zwischen zwei weiblichen Tieren die luteale Phase leicht zur Übereinstimmung gebracht werden.

Zur Verwendung von Hormonen sei - in Ergänzung zum Kapitel Ovulation - noch auf die Wirkung von Atropin und Progesteron hingewiesen.

Willett u. a. (192) verwendeten bei ihrer ersten erfolgreichen Eitransplantation Progesteron zur Gleichschaltung des Geschlechtszyklus. Versuche hatten gezeigt (191), daß durch tägliche Injektionen von 50-100 mg Progesteron, beginnend am 14. oder 15. Tag des Zyklus, die Brunstperiode auf 28 bis 34 Tage ausgedehnt werden kann. Die Brunst tritt durchschnittlich am 5. Tag nach Abbruch der Behandlung auf.

Über ähnliche Ergebnisse berichteten Ulberg u. a. (177).

Wird das Progesteron erst kurz vor der Brunst injiziert, so wirkt es beschleunigend auf den Ablauf der Brunst. Hansel u. Trimberger (109) fanden:

5-10 mg Progesteron, unmittelbar vor der Brunst injiziert, reduzierte die durchschnittliche Dauer der Brunst um 3, 6 Stunden und verkürzte das Intervall zwischen Brunstende und Ovulation um 5, 4 Stunden.

Eine weitere Möglichkeit zur Ovulationskontrolle besteht in der Beeinflussung von Faktoren, welche die Tätigkeit der Hypophyse regulieren. So blockiert Atropin eine Nervenbahn, die über den Hypothalamus zum Hypophysenvorderlappen führt, so daß es nicht zur Ausschüttung des Luteinisierungshormones kommt. Solange eine Kuh unter Atropineinfluß steht, unterbleibt der Follikelsprung. Auf diese Weise kann die Ovulation um mehrere Tage verzögert werden (87, 108).

3. Gleichschaltung des Geschlechtszyklus beim Schaf

Die Notwendigkeit der Synchronisierung des Sexualzyklus geht u. a. auch aus den Versuchen von Averill (20) hervor: Lag die Brunst von Spender- und Empfängertier innerhalb derselben 24-Stunden-Periode, so konnten 80 % der Eizellen erfolgreich transplantiert werden. Differierte der Geschlechtszyklus mehr als 24 Stunden, so reduzierten sich die erfolgreichen Transplantationen auf 20-50 %.

Hunter u. a. (114, 115) brachten den Geschlechtszyklus zur Übereinstimmung durch tägliche Injektionen von 10 mg Progesteron. Die Ergebnisse bei der Progesteronbehandlung sind jedoch recht unterschiedlich und wenig zuverlässig. Als Illustration diene folgende Übersicht:

Eintritt der Brunst in Bezug auf die Behandlung	Behandlung	
	während 14 T. je 10 mg Prog. (n. 142)	3-25 Tage je 10 mg Prog. (n. 114)
während der Behandl.	20 %	
1-3 Tage nach der letzten Injektion	70 %	47 %
3 u. mehr Tage n. d. letzten Inj.		37,5 %
ohne Brunst		15,5 %

4. Gleichschaltung des Geschlechtszyklus bei der Maus

Beatty (23) brachte den Geschlechtszyklus bei der Maus zur Übereinstimmung durch die Paarung des Empfängertieres mit einem vasktomierten männlichen Tier.

- - - - -

Die Synchronisierung des Geschlechtszyklus wird an Bedeutung verlieren, sobald es gelingt, Eizellen erfolgreich zu kultivieren. Ebenso werden bei einer großen Anzahl von Tieren immer einige sich in derselben Phase des Brunstzyklus befinden.

B. Die Technik der Eizellübertragung (Inovulation)

Entsprechend der Bezeichnung Insemination für die Übertragung von männlichen Samenzellen auf ein weibliches Individuum ist es sicher gerechtfertigt, das analoge Geschehen mit weiblichen Keimzellen, also jede Art des Verbringens von Eizellen in den Geschlechtsapparat eines weiblichen Tieres, unter dem Begriff Inovulation zusammenzufassen, wie dies Willett (194) vorschlägt.

1. Die Inovulation beim Kaninchen

a) unblutige Methode

Auf die Bedeutung einer unblutigen Übertragungsmethode wurde bereits hingewiesen. Wie beim Großtier, so ist auch bei Versuchstieren die Entwicklung einer unblutigen Technik wünschenswert. Bei der Maus führte Beatty (23) die zervikale Eiübertragung mit Erfolg durch. Ob entsprechende Versuche auch beim Kaninchen unternommen wurden, konnte aus der verfügbaren Literatur nicht ersehen werden.

b) Die Eiübertragung auf chirurgischem Wege

Über Schmerzausschaltung, Laparatomie und Freilegen des Geschlechtsapparates wurde im Kapitel Eigewinnung ausführlich berichtet. Das weitere Vorgehen richtet sich nach dem Inovulationsort.

Übertragung von Eizellen in den Eileiter:

Jeder mechanische Insult am Eileiter beeinträchtigt den Erfolg einer Transplantation und muß deshalb vermieden werden. Um den Eileitertrichter freizulegen, wird das reichlich vorhandene Fettgewebe mit stumpfen Pinzetten er-

faßt und durch einen Gehilfen in der geeigneten Lage gehalten. Eine Glas-pipette, in deren fein ausgezogener Spitze sich die Eizellen in wenig Flüssigkeit befinden, werden 5-20 mm in das abdominale Eileiterende eingeführt und vorsichtig ausgeblasen. Es ist besonders darauf zu achten, daß keine Luft insuffliert wird, daß Blutungen vermieden werden und daß nur minimale Flüssigkeitsmengen (höchstens 0,5 ml) zur Verwendung gelangen (10, 21, 54).

Übertragung von Eizellen in den Uterus:

Chang (52) überträgt Blastocysten, deren Größe 1-3 mm beträgt, mit einer 4 mm weiten Pipette. Diese wird durch eine 5 mm lange Inzision in das Uteruslumen eingeführt und ausgeblasen. Die Uteruswunde wird mit Catgut verschlossen.

2. Die Inovulation beim Rind

Soweit die Literatur verfügbar war, konnten 5 Arbeiten ermittelt werden über mehr oder weniger erfolgreiche Eizelltransplantationen beim Rind.

a) Umbough (178) übertrug 1, 16 und 17 Eizellen nach dem Flankenschnitt in die Eileiter. 2 Kühe abortierten nach 65 bzw. 112 Tagen.

b) Dowling 1949 (77) übertrug Eizellen mit einer Besamungspipette direkt in den Uterus. Von 8 Versuchen ergab jedoch keiner eine Trächtigkeit.

c) Lammung u. Rowson 1952 (121) führten die negativen Ergebnisse bei der zervikalen Inovulation zurück auf die erhöhte Infektionsempfindlichkeit der Gebärmutter während der lutealen Phase. Um dieses Hindernis zu umgehen, verwendeten sie zur Transplantation ein Instrument, an dessen Spitze die Eizellen in Gelatine eingebettet lagen. Dieses Instrument wurde durch die Zervix in den Uterus eingeführt, die Uteruswand perforiert und die Eizellen - unter rektaler Kontrolle - in die Ligg. ovarii deponiert, wo die Gelatine schmelzen, die Eizellen frei werden und in die Eileiter gelangen sollten. Die Versuche waren jedoch erfolglos. Diese Methode hat überdies den Nachteil, daß nur tubale Eizellen verwendet werden können, die beim Rind schwierig zu gewinnen sind.

d) Willet u. a. 1951 (192) führten die erste erfolgreiche Eitransplantation beim Rind durch. Ein 8-zelliges Ei wurde in der Nähe der Eileitereinmündung mit einer Mikropipette in das Uterushorn implantiert. 278 Tage nach der Besamung des Spendertieres wurde ein weibliches Kalb geboren. Äußere Erscheinung des Tieres, Blutgruppenbestimmungen, die Unwahrscheinlichkeit, daß mit der Eizelle auch Spermia vom Spendertier übertragen wurde und daß eventuelle Eizellen beim Empfängertier noch befruchtungsfähig gewesen wären - dies alles be-

stätig zweifellos, daß das Junge sich aus der transplantierten Eizelle entwickelt hatte.

e) Bei der Reproduzierung dieses Versuches gelang es Willett u. a. 1953 (195), in zwei weiteren Fällen transplantierte Eizellen zu geburtsreifen Föten weiter zu entwickeln.

3. Die Transplantation bei den übrigen Tieren

Auch über die Transplantation bei Labortieren, kleinen Wiederkäuern und beim Schwein liegen Berichte vor. Alle Autoren (mit zwei Ausnahmen) übertrugen die Eizellen nach chirurgischer Eröffnung der Bauchhöhle.

Ratte: Nicholas (139), Noyes (141)

Maus: Beatty (23), Boot u. a. (30), Fekete u. Little (88),
Gates u. Runner (94), Mc Laren u. a. (133), Runner (164)

Ziege: Warwick u. Berry (184)

Schaf: Hunter u. a. (115), Averill (20), Casida u. a. (43), Lopyrin u. a. (124, 125), Warwick u. Berry (184)

Schwein: Kvasnickii (117).

Die unblutige Eiübertragung durch die Zervix wurde nur durch Beatty (23) bei der Maus und von Kvasnickii (117) beim Schwein mit Erfolg durchgeführt.

Hunter u. a. (115) verwendeten zur Inovulation eine Pasteurpipette, die entweder durch den Eileitertrichter eingeführt oder mit der die Spitze des Uterushornes punktiert wurde.

Averill (20) führte reziproke Transplantationen zwischen Schafen verschiedener Rassen durch:

Spender	Empfänger	Total transpl. Eizellen	Junge	
			Anzahl	%
Welsh Mountain	Border Leicester	20	12 ⁺	60
Border Leicester	Welsh Mountain	30	15	50

+) 4mal Zwillinge

C. Die Transplantation zwischen verschiedenen Tierarten

Averill u. a. (19, 20) ist es gelungen, Schafoozyten auf Kaninchen zu übertragen und mit Erfolg weiter zu entwickeln bis zum Blastocystenstadium, Rückübertragung auf Schafe ergab normale Gravidität (s. S. 46).

Warwick u. Berry (184) führten reziproke Transplantationen durch zwischen Schafen und Ziegen. Versuche hatten ergeben, daß Ziegen, die von Schafböcken gedeckt worden waren, trächtig wurden. Die Embryonen starben jedoch vor Ende der Trächtigkeit (182). Die Transplantationsversuche sollten deshalb die Antwort ermitteln auf die Frage, ob die embryonale Mortalität zurückzuführen sei auf eine Unverträglichkeit und Disharmonie der Gene und Chromosomen, oder auf gewisse ungünstige, uterine Bedingungen.

Resultate:

Der Erfolg der reziproken Transplantationen während 8 Jahren war sehr unterschiedlich und schwankte zwischen 0 und 37 %. Einzelne Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Jahr	Spender	Empfänger	Transplantationen			Bemerkungen
			Anzahl	positiv	in %	
1933	Schaf	Ziege	4	-	-	
	Ziege	Schaf	2	-	-	
	Schaf	Schaf	3	1	33	Kontrolle
	Ziege	Ziege	1	-	-	Kontrolle
1941	?	?	8	3	37	Kontrolle
1943	Schaf	Ziege	15	5	33	+))

+) zwischen dem 30. und 50. Tag geschlachtet.

? Rasse mäßige Zugehörigkeit nicht angegeben.

Über die Eizellübertragung zwischen verschiedenen Nagetieren berichten Briones u. a. (33).

D. Faktoren, welche die Entwicklung transplantierter Eizellen beeinflussen

1. Eialter

a) unbefruchtete Eizellen

Die Übertragungsversuche mit Oozyten, die aus Follikeln gewonnen wurden, geben Aufschluß, wie weit die Eireifung für die Befruchtung notwendig ist. Die Untersuchungen von Chang (69) seien kurz zusammengefaßt:

Versuchsanordnung:

Die Spendertiere erhielten eine intravenöse Injektion eines Schaf-Hypophysen-Extraktes zur Ovulationsauslösung. Nach der Injektion wurden in zweistündigen Intervallen die Ovarien entfernt und in ein Medium eingelegt, das zu gleichen Teilen aus physiologischer Kochsalzlösung und Kaninchenserum bestand. Die Follikel wurden unter dem Mikroskop punktiert, die in den Cumulus oophorus eingebetteten Oozyten mit einer Pipette aufgesogen und für 5-10 Minuten in das gleiche Medium verbracht, welches jedoch noch zusätzlich 0,05 % Hyaluronidase enthielt, damit sich die kompakte Masse der Follikelzellen auflockerte.

Als Transport und Aufbewahrungsmedium wurde wieder eine Lösung von physiologischer NaCl und Kaninchenserum zu gleichen Teilen verwendet.

Die Empfängertiere erhielten zur Gleichschaltung des Zyklus ebenfalls eine i. v. Injektion eines Schaf-Hypophysen-Extraktes. Gleichzeitig wurden sie künstlich besamt. 6-7 Stunden später wurden die Oozyten mit einer Pipette durch das Infundibulum tubae in den Eileiter übertragen. Da es schwierig wäre, übertragene Eizellen von Oozyten des Empfängertieres zu unterscheiden, wurde auf der Seite der Transplantation das Ovar exstirpiert. Ein Progesterondefizit, welches durch die einseitige Kastration zu erwarten war und das möglicherweise die Gravidität beeinflussen konnte, wurde durch eine einmalige Injektion von 25 mg Progesteron zwischen dem 4. und 6. Tag nach der Operation ausgeglichen. Die Kaninchen wurden 19 bis 22 Tage nach der Transplantation getötet und untersucht.

Resultate:

- Je mehr Stunden zwischen ovulationsauslösender Injektion und Eigewinnung liegen, d. h. je weiter die Eireifung fortgeschritten ist, desto größer ist die Chance, daß eine Eizelle befruchtet wird und sich weiter entwickeln kann.
- Am besten entwickeln sich Oocyten, die 11-12 Stunden nach der i. v. Injektion aus dem Eileiter gewonnen werden.

- Follikeleizellen, die unmittelbar nach der Injektion gewonnen und während 8-10 Stunden kultiviert wurden, zeigten typische Merkmale der Kernreifung. Nach der anschließenden Transplantation entwickelten sie sich jedoch nicht weiter.

b) Befruchtete Eizellen

Eine Übersicht über die prozentuale Weiterentwicklung von Kanincheneiern, die zu verschiedenen Zeiten ihrer Furchung transplantiert wurden, gibt keinen Hinweis auf ein Eialter, das zur Transplantation als optimal zu bezeichnen wäre (s. folgende Tabelle).

Eizellen				Empfänger, die gravid wurden %	Weiterentwickl. bezogen auf		Lit.
Alter (Std.)	Zell-Stadium	Gewonnen aus	übertragen in		Alle Eizellen %	Gravide Tiere	
24		Tube	Tube	87,5	54,0	62,2	52
24		Tube	Tube		81,3		21
	2-8	Tube		38,7	18,4		3
	2	Tube			40		1
48		Tube	Uterus	71,4	22	28,7	52
	16-32			46,6	23,8		3
62		Tube	Uterus		78		77
72		Tube	Uterus	45,5	31		52
96		Uterus	Uterus	76,5	43	58,7	52
144		Uterus	Uterus	85,7	42	47,7	52

Auf eine ausgesprochene Labilität der 4-Tage-Blastocysten weist Chang (52) hin (s. S. 44).

Willett u. a. (195) berichten, daß bei den erfolglosen Transplantationen beim Rind die Eizellen je 4 Blastomeren, in den drei erfolgreichen Versuchen jedoch 8, 10 und 12 Blastomeren aufgewiesen haben.

Diese wenigen Versuche gestatten jedoch nicht, ein abschließendes Urteil zu fällen über den Einfluß des Eialters auf den Erfolg der Transplantation.

2. Die Bedeutung des Ovulationstermins des Empfängertieres

S. Gleichschaltung des Geschlechtszyklus S. 47 ff.

3. Die Bedeutung des Transplantationsortes

Übertragungsversuche mit 2-Zell-Eiern, die aus dem Eileiter gewonnen und in den Uterus übertragen wurden, führten in keinem Fall zur Weiterentwicklung (50). Werden sie jedoch in den Eileiter des Empfängertieres übertragen, so können bis 81 % zu einer Gravidität führen (21). Aus diesen, wenn auch extremen Angaben, ist ersichtlich, daß es notwendig ist, daß die Eizellen in jenen Teil des weiblichen Geschlechtstraktes übertragen werden, der ihrem Furchungsstadium entspricht. Solange keine Möglichkeit besteht, Eizellen in der Kultur weiter zu entwickeln, muß der Gewinnungsort mit dem Inovulationsort - von Grenzfällen abgesehen - übereinstimmen.

4. Zahl der transplantierten Eizellen

Um den Erfolg einer Eitransplantation nicht zu gefährden, sollten nicht mehr Eizellen übertragen werden, als normalerweise zur Ovulation gelangen. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, daß nach experimenteller Superovulation durch Gonadotropine die Zahl der Jungtiere nur wenig größer, manchmal sogar kleiner ist. (43, 86, 103). Kühe mit mehr als drei Früchten abortieren meist innerhalb von 5 Monaten (103).

5. Uterine Infektionen

Die unbefriedigenden Resultate, die bei intrazervikaler Transplantation von Eizellen erzielt wurden, sind offenbar zurückzuführen auf die erhöhte Empfänglichkeit des Uterus für Infektionen während der lutealen Phase des Geschlechtszyklus. Diese Beobachtung konnte gemacht werden bei intrauterinen Inseminationen, wenn der Eierstock ein aktives Corpus luteum trug (25, 34, 138, 161, 190, zit. n. 194).

Rowson u. a. (162) und Black u. a. (26) konnten zeigen, daß der Uterus

während der lutealen Phase des Zyklus sehr empfänglich, während der folliculären Phase jedoch außerordentlich resistent ist gegenüber Infektionen. Diese Tatsache bildet natürlich für unblutige, zervikale Transplantationen ein großes Hindernis. Ob es durch die Verwendung von Antibiotica überwunden werden kann, bleibt noch abzuklären.

6. Narkose

Daß Narkotica nicht ohne Einfluß sind auf die Eizellen, geht schon aus den Untersuchungen von Austin u.a. (16) hervor (s.S. 28).

Auch Willett u.a. (195) betrachten die Totalnarkose als eine der möglichen Ursachen, die für das Mißlingen von Transplantationsversuchen verantwortlich zu machen sei. Wie weit dieser Verdacht gerechtfertigt ist, werden weitere Untersuchungen zu zeigen haben.

7. Die Unterstützung der Gravidität

Canivenc u.a. (38) gelang es, bei graviden Ratten, die am 4. Tag der Trächtigkeit kastriert wurden, durch tägliche Injektionen von 10 mg Progesteron die befruchteten Eizellen während längerer Zeit frei im Uterus zu erhalten. Die zusätzliche Anwendung von schwachen Dosen Östradiol bewirkte die Implantation der Eizellen.

Chang (69) unterstützte die Trächtigkeit von einseitig kastrierten Kaninchen durch eine einmalige Injektion von 25 mg Progesteron (s.S. 55).

Durch die Injektion von Progesteron gelang es auch, transplantierte Eizellen bei Kaninchen weiter zu entwickeln, obwohl die Empfängertiere nicht ovuliert hatten (58).

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß das Progesteron ein Mittel ist, welches gestattet, Nidation und Weiterentwicklung von transplantierten Eizellen günstig zu beeinflussen.

Z W E I T E R T E I L

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. DIE EIGEWINNUNG AM TOTEN TIER

Wie aus dem ersten Teil ersichtlich ist, beruhen unsere Kenntnisse über die Physiologie der Säugereizelle und über die Faktoren, welche die Transplantation beeinflussen, zum größten Teil auf Untersuchungen am Kaninchen. Dies hat seinen Grund darin, daß entsprechende Experimente an Rindern technisch schwierig durchzuführen sind und daß sich solche Versuche recht kostspielig gestalten.

Nachdem L a m m e r s (120) zeigte, daß es möglich ist, am Schlachthof aus den Geschlechtsorganen frisch geschlachteter Kühe Eizellen herauszuspülen, drängte sich die Frage auf, ob sich solche Eizellen nicht für weitere Untersuchungen verwenden ließen.

A. Die Isolierung von Eizellen aus Schlachthofmaterial

Zunächst handelte es sich darum, Erfahrungen zu sammeln über die Technik der Eigewinnung sowie über die Behandlung der Eizellen. Die Beschaffung von Material gestaltete sich dank dem Entgegenkommen der Direktion des Schlachthofes München relativ einfach.

Auf eine rektale und vaginale Untersuchung der lebenden Kühe mußte allerdings verzichtet werden, obwohl es natürlich wünschbar und von Vorteil gewesen wäre, wenn geeignete Tiere, d.h. solche, die brünstig waren oder deren Eierstöcke frische Ovulationsstellen aufwiesen, vorher hätten markiert werden können.

An den Hauptschlachttagen wurden in zwei Schlachthallen bei allen Kühen nach der Eröffnung der Bauchhöhle und Exenteration der Eingeweide die Eierstöcke auf ihre Funktionsstadien untersucht. Zeigte ein Ovar eine frische Ovulationsstelle oder ein Corpus luteum, das nach Aussehen, Form und Konsistenz noch nicht älter als vier Tage sein konnte, so wurden Ovar, Eileiter und Spitze des Uterushornes entfernt und in physiologische Kochsalzlösung oder in Tyrodelösung eingelegt. Das Durchspülen der Organe erfolgte am gleichen oder am folgenden Tag im Institut der gynäkologischen Tierklinik.

In einer ersten Reihe von Versuchen sollte abgeklärt werden, welche Methode der Eigewinnung am erfolgversprechendsten war. Zu diesem Zweck wurden die

Eileiter in auf- und absteigender Richtung, als Ganzes und in verschiedenen Teilstücken, mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit Tyrodelösung durchgespült. Dabei konnten folgende Erfahrungen gesammelt werden:

1. Je kürzer die Zeitspanne ist, die zwischen Ovulation und Eigewinnung liegt, desto größer ist die Chance, daß eine Eizelle gefunden wird. Beim Durchspülen von Eileitern, deren zugehöriger Eierstock ein festorganisiertes, mehr als vier Tage altes Corpus luteum aufwies, konnte nie eine Eizelle isoliert werden.
2. Der Eileiter soll nach Möglichkeit als Ganzes gespült werden. Bei einer fraktionierten Spülung werden bei jedem Einführen und Fixieren der Kanüle 10 - 15 mm zerstört, in denen möglicherweise sich die Eizelle befinden kann.
3. Das Durchspülen in einzelnen Teilen ist dann angezeigt, wenn der Eileiter an einer Stelle unpassierbar ist.
4. Das Durchspülen in ascendierender Richtung hat den Nachteil, daß das Lumen des Eileiters immer weiter und dadurch der Druck der Spülflüssigkeit immer geringer wird. Zudem kann es passieren, daß die in der Uterushornspitze reichlich vorhandenen Detritusmassen den Eileiter verstopfen. Bei der Anwendung verstärkten Druckes kommt es leicht zu Schleimhautläsionen, so daß sich die Spülflüssigkeit in das subseröse Gewebe ergießt.
5. Die Spülung in aufsteigender Richtung wurde dann angewandt, wenn bei der vorangegangenen, uteruswärts gerichteten Spülung keine Eizelle gefunden werden konnte. In diesem Fall wurde die Fimbria weggeschnitten und das abdominale Ende des Eileiters zunächst mit einer Klemme verschlossen, damit sich der Eileiter prall füllen konnte.
6. Die Verwendung von Tyrodelösung gegenüber physiologischer Kochsalzlösung hat keinen erkennbaren Vorteil.
7. Die im Folgenden beschriebene Methode hat sich zur Gewinnung von Eizellen als recht brauchbar erwiesen:

Die Organe werden in einer Schale, deren Boden zum Schutz vor Austrocknung mit einer isotonischen Salzlösung bedeckt ist, präpariert. Das Ovar wird entfernt. Die Spitze des Uterushornes wird mit einer Arterienklemme festgehalten. Mit Pinzette und spitzer Schere kann so das Mesovar entfernt werden, ohne daß der Eileiter berührt zu werden braucht. Dann wird durch das Infundibulum tubae eine Knopfkanüle eingeführt und kreuzweise mit zwei Arterienklemmen fixiert. Der Kanülenansatz wird hierauf in einem Stativ so befestigt, daß der Eileiter entspannt und senkrecht herunterhängt. Die Spitze des Uterushornes, die oft reichlich Schleim und Zelltrümmer enthält, wird an der Eileitereinmündung

abgeschnitten. Nun kann eine Injektionsspritze angesetzt werden. Die Spülflüssigkeit wird in Uhrgläsern aufgefangen. In das erste Glas kommen nur wenige Tropfen. Diese enthalten meist neben einer mehr oder weniger großen Detritusmasse die Eizelle. Der Druck auf den Kolben der Spritze ist sorgfältig zu erhöhen, da sich das Eileiterende oft aufrümmt und deshalb die Spülflüssigkeit leicht neben das Uhrglas gerät. Da die Salzlösung rasch verdunstet, wird zu den ersten Tropfen noch reine Spülflüssigkeit hinzu gefügt.

Die Eizelle kann nicht immer im ersten Uhrglas aufgefunden werden. Es ist deshalb angezeigt, die Eileiter mit 1 bis 3 cc durchzuspülen und die Flüssigkeit in einer entsprechenden Anzahl Gläsern aufzufangen.

B. Die Untersuchung der Spülflüssigkeit

Die Eizelle sedimentiert dank ihres größeren spezifischen Gewichtes rasch gegen die Mitte des Uhrglases hin, wo sie relativ leicht aufgefunden werden kann. Zur Untersuchung eignet sich am besten die schwache 12- bis 25-fache Lupenvergrößerung eines Stereomikroskopes. Sind in der Spülflüssigkeit abnorm viele Zelltrümmer vorhanden, so wird das Auffinden der Eizelle erleichtert, wenn diese Detritusmassen mit einem feinen Glasstab unter mikroskopischer Kontrolle beiseite geschoben werden. Die Eizelle selbst ist, wie jedes Nativpräparat, außerordentlich kontrastarm. Sie fällt auf durch ihre kreisrunde, im Stereomikroskop kugelige Gestalt, den schmalen transparenten Hof darum herum (Zona pellucida) und durch die gleichmäßige, sehr blasse, gelblich-grüne Färbung. Der Durchmesser beträgt zwischen 160 und 175 μ .

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Eizellen auf Hohlschliff-Objektträger übertragen. Hierzu fanden selbst ausgezogene Kapillarpipetten Verwendung, in welche die Eizellen leicht aufgesaugt werden können mit Hilfe eines angeschlossenen Gummischläuchleins. Die Objektträger wurden soweit mit isotonischer Salzlösung gefüllt, daß ein Deckglas ohne Luftblasenbildung aufgesetzt werden konnte.

Da diese geringen Flüssigkeitsmengen bei Zimmertemperatur schon in wenigen Minuten verdunsteten, müssen entsprechende Vorkehrungen getroffen werden. Sehr gut geeignet haben sich zur Aufbewahrung der Präparate Petrischalen, deren Boden mit derselben Flüssigkeit bedeckt war. Zwei kleine Unterlagen schützten die Objektträger vor der Berührung mit der Flüssigkeit. In späteren Versuchen wurden die Deckgläser mit Paraffinwachs abgedichtet.

C. Diskussion

Nachdem die ersten Schwierigkeiten überwunden waren, betrug die Ausbeute der auf diese Weise aus Schlachthoforganen gewonnenen Eizellen 60 bis 100 %. Die absolute Zahl ist jedoch sehr klein. Pro Schlachttag wurden nie mehr als 2-5 Eizellen isoliert. Die Gründe für dieses spärliche Ergebnis sollen kurz erwähnt werden; denn wenn es möglich wäre, daß solche Eizellen weiter "verwertet" werden könnten, so kann durch eine geeignete Organisation die Ausbeute leicht vervielfacht werden.

1. Infolge der außerordentlich raschen Schlachtfolge konnten meist nur in einer Halle die Organe kontrolliert werden .
2. Sehr viele Ovarien konnten nicht beurteilt werden, sei es, daß sie bei der Exenteration der Geschlechtsorgane verloren gingen, sei es, daß die für ihre Konfiskation verantwortlichen Angestellten zuvorgekommen sind.
3. Um die Eileiter rasch nach der Schlachtung der Kühe durchspülen zu können - die Vitalität der Eizellen sollte nach Möglichkeit erhalten bleiben - wurde die Zeit der Organauslese am Schlachthof auf 2-4 Stunden begrenzt. Nun gestattete aber die räumliche Distanz zwischen Schlachthof und Institut nicht, am gleichen Tag mehr als einmal Organe zu holen.

Übersicht über die erste Versuchsreihe zur Eigewinnung:

Ovar-No.	Spül-Richtung	Spülflüssig-keit	Resul-tat	Bemerkungen
1	asc.	NaCl	-	distales Viertel nicht durchgängig, mußte abgeschnitten werden
2	desc.	NaCl	-	
3	asc.	NaCl	-	miliare Eileiterth.
4	desc.	Tyrode	+	Ovar mit 2 Corp. lut.
5	asc.	Tyrode	+	
6	asc.	Tyrode	+	
7	desc.	Tyrode	-	C.l. ca. 48 Std. alt
8	asc.	Tyrode	-	
9	desc.	NaCl	+	
10	desc.	NaCl	-	C.l. ca. 3 Tage alt.
11	asc.	NaCl	+	Ovar mit 2 Corp. lut.
12	desc.	NaCl	+	

Total gespülte Eileiter	12, davon positiv	6
Mit Tyrode-Lös. gespült	5, " "	3
Mit NaCl gespült	7, " "	3
ascendierend gespült	6, " "	3
descendierend gespült	6, " "	3

II. UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS DER VITALITÄT DER EIZELLEN

Wie die Vorversuche gezeigt haben, ist es verhältnismäßig einfach, aus Schlachthofmaterial Eizellen vom Rind zu isolieren. Es fragt sich nur, ob solche Eizellen noch praktisch verwertbar sind, oder mit anderen Worten, ob sie noch leben und für weitere Untersuchungen (Parthenogenese, Befruchtung, Transplantation) verwendet werden können. Um diese Frage abzuklären, wurden verschiedene Methoden zur Überprüfung der Vitalität von Eizellen ausprobiert.

A. Mikroskopische Untersuchung

Alle Eizellen wurden nach der Übertragung auf Hohlschliffobjektträger im Phasenkontrastmikroskop untersucht bei einer maximal 800-fachen Vergrößerung. Der Vorteil des Phasenkontrastmikroskops liegt in der Möglichkeit, minimale Phasenunterschiede, wie sie durch wenig verschiedene Brechungskoeffizienten verursacht werden, in Amplitudendifferenzen umzuwandeln, die vom menschlichen Auge wahrgenommen werden können.

Von 41 untersuchten Oozyten befanden sich 37 im Einzell-Stadium. 4 Eizellen wiesen je 2 Blastomeren auf.

Der Zellkern nimmt den größten Raum der Eizelle ein. Bei jungen Oozyten erscheint er kreisrund und liegt zentral. Gegen das Zytoplasma ist er scharf begrenzt. In seinem Innern ist er gleichmäßig durchsetzt von feinen, stärker lichtbrechenden Granula. Liegen sie in der Brennebene, so erscheinen sie dunkel; liegen sie außerhalb, so präsentieren sie sich als helle Flecken.

Das Cytoplasma erscheint bei jungen Oozyten nur als ganz schmaler Randsaum und ist scharf begrenzt. Einzelne darin eingeschlossene, stärker lichtbrechende Granula, die möglicherweise den Mitochondrien entsprechen, zeigen ausgeprägte Brown'sche Molekularbewegung.

Die in fixiertem und gefärbtem Material beschriebenen Einzelheiten (Macula germinativa, Oozentrum) können nicht unterschieden werden.

Der perivitelline Spalt ist sehr schmal und oft nur undeutlich sichtbar.

Die Zona pellucida erscheint gleichmäßig getönt als homogene, einfach lichtbrechende, strukturlose Masse von 8 - 15 μ Breite. Ihre Oberfläche hat oft ein höckeriges Aussehen. In einzelnen Fällen konnten noch adhärierende Follikel-epithelzellen beobachtet werden.

Bei keinem einzigen Ei konnte eine Polzelle gesehen werden. Auch Lammers (149) macht keine diesbezüglichen Angaben. Ob die Ursache dieses Befundes in einer mangelhaften mikroskopischen Technik zu suchen ist, oder ob sich die Reifeteilungen beim Rind zeitlich verschieden einstellen gegenüber den übrigen Tieren, soll hier nicht entschieden werden.

Haben die untersuchten Eizellen noch gelebt? Leider muß diese Frage unbeantwortet bleiben. Eine cytoplasmatische Strömung konnte nie beobachtet werden. Außer der häufig sichtbaren Molekularbewegung der im Vitellus eingeschlossenen Granula konnte nur bei einem zweizelligen Ei im Plasma eine "flimmern-de" Bewegung festgestellt werden, die sich von den übrigen Befunden unterschied und die nach einigen Stunden aufhörte.

Die mikroskopische Untersuchung gestattete also nicht, die Vitalität der Eizellen zu beurteilen.

Huhn (113) beschreibt zwar das Aussehen von normalen und degenerierten Eizellen, aber ohne anzugeben, auf was für Beweise er die angeführten Kriterien stützt.

B. Veränderungen der Eizellen nach verschiedenen Temperatureinwirkungen

Da die unbefruchteten Eizellen der Laboratoriumstiere (Kaninchen, Ratte, Hamster) eine große Bereitschaft zeigen zu morphologischen Veränderungen, zu Fragmentation und parthenogenetischer Furchung (s. S. 28 ff.), wurden Versuche unternommen, durch Aufbewahrung der Oocyten bei verschiedenen Temperaturen solche Lebensäußerungen zu provozieren. Eine Eizelle, die sich parthenogenetisch zu teilen vermag, ist sicher noch nicht tot, auch wenn sie nicht mehr befruchtungsfähig sein sollte.

1. Einfluß von Temperaturen zwischen 0° und 4° C.

Da durch Hypothermie bei Ratten und Hamstern bis zu 100 % eine Aktivierung der Eizellen erreicht werden kann, wurde eine Serie von Rinder-Oocyten im Kühlschrank bei 0-4° C aufbewahrt und in verschiedenen Intervallen kontrolliert.

Eine Aktivierung konnte in keinem Fall erreicht werden. Die meisten Kerne und auch das Cytoplasma zeigten Schrumpfungerscheinungen. Der perivitelline Spalt verbreiterte sich. Die Umrisse von Kern und Plasma blieben jedoch scharf. Die Kerne zeigten Tendenz zu Vakuolenbildung, die mit der Dauer der Unterkühlung zunahm. Bei einigen Oozyten kam es zur Zusammenballung von Kerngranula.

2. Der Einfluß der Zimmertemperatur

Aus der zweiten Serie von Eizellen, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, seien drei Fälle beschrieben. Das Alter der Eizellen wurde geschätzt auf Grund der Beurteilung der zugehörigen Gelbkörper nach Farbe, Größe, Beschaffenheit und Konsistenz.

No. 19: ca. 3 Tage alt. Kern bereits geschrumpft. Perivitelliner Spalt breit. Nach 24 und 48 Stunden unverändertes Aussehen. Die Eizelle war offenbar im Zeitpunkt der Untersuchung schon längere Zeit tot.

No. 21: max. 24 Stunden alt. Kreisrunder, konzentrisch gelagerter Kern, scharf umgrenzt und gleichmäßig granuliert. Deutliche Brown'sche Molekularbewegung im Cytoplasma.

Nach 15 Stunden: Kernmembran nur undeutlich wahrnehmbar, erscheint an einzelnen Stellen zerstört mit Austritt von Kernpartikelchen ins Plasma.

No. 32: 24-36 Stunden alt. Kern homogen strukturiert. Cytoplasma geringgradig deformiert. Nach 6 Stunden zeigt der Kern deutliche Fragmentation. Nach 30 Stunden besteht er aus zwei etwa gleich großen Teilen, die undeutlich voneinander abgegrenzt sind. Die Granula haben sich zum größten Teil auf die eine Hälfte zurückgezogen.

Auch bei Zimmertemperatur gelang es nicht, die parthenogenetische Teilung von Oozyten zu provozieren. Einzelne Eizellen zeigten teilungsähnliche Stadien, die jedoch zweifellos als degenerative Fragmentation anzusprechen waren.

3. Die Aufbewahrung der Eizellen bei 37° C.

Eine weitere Serie von Eizellen wurde im Brutschrank inkubiert bei einer Temperatur von 37-38° C. Die zugehörigen Organe waren schon am Schlachthof in Thermosflaschen mit körperwarmer, isotonischer Salzlösung eingelegt worden und wurden im Institut auch mit 38° C warmen Lösungen gespült.

Diese Eizellen zeigten weder parthenogenetische Teilungen noch Fragmentation. Die Kernmembran erschien schon nach wenigen Stunden aufgelockert und vermehrt durchlässig. Kernbestandteile traten aus ins Cytoplasma und in die Zona pellucida. Alle Zellgrenzen präsentierten sich verwischt.

Es scheint, daß Oozyten in vitro Körpertemperaturen schlecht vertragen. (Für Kanincheneizellen beträgt die optimale Aufbewahrungstemperatur 10°C . s. S. 43).

C. Befruchtungsversuche

Da alle Experimente, durch Einwirkung verschiedener Temperaturen die Eizellen zu aktivieren, fehlschlugen, wurde versuchsweise noch der Einfluß von Sperma studiert.

Ei No. 9: Höchstens 36 Stunden alt. Ohne mikroskopisch wahrnehmbare Degenerationserscheinungen. Ein Tropfen unverdünntes Bullensperma wurde auf dem Objektträger, am Rand des Deckglases, deponiert. Die Untersuchung erfolgte unter einem Mikroskop mit heizbarem Objektisch. Die Spermien drangen rasch bis zur Eizelle vor; es gelang ihnen aber nicht, die Zona pellucida zu durchdringen. Das Präparat wurde im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt (zum Schutze vor Austrocknung in einer feuchten Petrischale), und stündlich kontrolliert. Die Motilität der Spermien blieb während 1 Stunde recht gut, nahm aber nach 2 Stunden rasch ab und erlosch nach 5 Stunden ganz. Es gelang keinem Spermium, in das Innere der Eizelle zu gelangen. Nach 24 und 48 Stunden machte sich im Zellkern eine zunehmende Vakuolenbildung bemerkbar.

Auf den ersten Blick schien es allerdings, als ob einzelne Spermien in die Zona pellucida und in den Vitellus eingedrungen seien. Bei genauer Einstellung der Brennebene und exakter, kritischer Interpretation des Bildes ließ sich aber unschwer erkennen, daß sich die Spermien unter oder über der Eizelle befanden, wo sie kleben geblieben waren. Es mag dies ein Hinweis sein, daß nur durch ununterbrochenes Verschieben der Focalebene eine zuverlässige Beurteilung eines mikroskopischen Bildes möglich ist, und daß eine einzige Ansicht, wie sie eine Photo- oder Filmaufnahme darstellt, leicht ein täuschendes Bild ergeben kann.

In drei weiteren Versuchen wurden die herausgeschnittenen Uteri, deren Ovarien ganz frische Ovulationsstellen aufwiesen, am Schlachthof direkt besamt. Die Besamungspipette wurde soweit als möglich in die Uterushörner eingeführt, die Eileiter nachher ligiert, ebenso das Uterushorn und die Organe in körperwarmer Tyrodelösung eingelegt. Die Spülung erfolgte nach 2-3 Stunden.

Resultat: In der Spülflüssigkeit konnten keine Spermien nachgewiesen werden.

Die Eizellen waren weder befruchtet noch sonst aktiviert worden. In einem Fall zog sich die Kernsubstanz während der Beobachtung plötzlich zusammen, so daß nachher die Kernmembran gefältelt erschien. Es ist möglich, daß diese Eizelle noch gelebt hat. Eine Eizelle erschien "gestaucht": Oolemm und Cytoplasma zeigten an einer Stelle eine muldenförmige Einbuchtung. Die dritte Eizelle wies einen geschrumpften Kern mit Vakuolenbildung auf.

III. MEHRZELLIGE OOZYTEN

Von den 41 untersuchten Eizellen befanden sich vier in geteiltem Zustand. Sie wiesen je zwei Blastomeren auf.

1. No. 23:

Das zugehörige Ovar zeigte zwei ganz frische Ovulationsstellen, die höchstens 24 Stunden alt sein konnten. Die Organe waren am Schlachthof in Tyrodelösung verbracht worden (ca. 18° C). Die Durchspülung erfolgte 5 Stunden später. Die Eizelle wies zwei Blastomeren auf von unterschiedlicher Größe, deren scharfe Umrisse sich im mikroskopischen Bild überschneiden. Im Plasma war eine flimmernde Bewegung sichtbar. Das Präparat wurde bei 37° C aufbewahrt. Nach 15 Stunden füllte die Kernmasse fast die ganze Eizelle aus. Die beiden Blastomeren konnten nur noch undeutlich voneinander unterschieden werden.

Ob es sich um ein befruchtetes Ei gehandelt hat, konnte nicht ermittelt werden. Dafür sprechen:

- Bei allen anderen Eizellen war es nicht möglich, eine Aktivierung zu erreichen.
- Parthenogenetische Teilungen wurden bei Rindereizellen bisher nicht beobachtet.
- Es ist durchaus möglich, daß am Schlachthof, wo Bullen und Kühe nebeneinander aufgeführt und geschlachtet werden, einmal ein Tier gedeckt wird.

Dagegen sprechen:

- Das zugehörige Zwillingssei befand sich im 1-Zell-Stadium.
- Eine Polzelle konnte nicht beobachtet werden.
- weitere Furchungen unterblieben.

2. No. 37:

Ca. 36 Stunden alte Eizelle, die von einem Jungrind stammte. Untersuchung drei Stunden nach der Schlachtung: Kern deutlich zweigeteilt. Die Granulierung

erstreckte sich auf etwa $3/4$ der beiden ziemlich gleich großen "Blastomeren". Die Kernmembran erschien geschädigt. Die Eizelle wurde in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 6 Stunden füllten die Kerngranula beide Fragmente, die absolut gleichwertig erschienen, ganz aus. Die Ränder des Kernes erschienen unscharf und an einer Stelle geschädigt. Nach 48 Stunden konnte im Plasma, an der keilförmig eingezogenen Verschmelzungsstelle der beiden Blastomeren eine kleine, kreisrunde Stelle beobachtet werden, die auffiel durch eine Anhäufung stärker lichtbrechender Granula. (Polzelle?) Sonst blieb das Bild unverändert.

3. No. 43:

Ca. 24 Stunden alt. Bestand aus 2 scharf umrandeten, ungleichen "Blastomeren", deren Durchmesser im Verhältnis 2:3 standen. Innerhalb 24 Stunden löste sich die Kernmembran auf. Die beiden Fragmente konnten aber nach 8 Tagen noch unterschieden werden.

4. No. 45:

Ca. 24 Stunden alt. Schien bei der ersten Untersuchung sich gerade in Teilung zu befinden. 1 Stunde später besaß es zwei ungefähr gleich große Blastomeren.

In keinem der vier Fälle war es möglich abzuklären, ob es sich um echte Blastomeren befruchteter Eizellen, um parthenogenetische Teilungsstadien oder um besondere Degenerationsformen gehandelt hat.

IV. DISKUSSION

Alle Versuche, die Vitalität von unbefruchteten Eizellen nachzuweisen, haben fehlgeschlagen. Wahrscheinlich waren alle Eizellen im Moment der Untersuchung schon tot. Sollten sie noch gelebt haben, so müssen andere Methoden entwickelt werden, die es gestatten, Lebens- und Befruchtungsfähigkeit von Eizellen zu überprüfen, sei es durch eine verbesserte, mikroskopische Technik, sei es durch die Anwendung von biologischen und mikrochemischen Reaktionen.

Es ist klar, daß die geringe Anzahl der untersuchten Eizellen - schon aus statistischen Gründen - kein abschließendes Urteil gestattet über die Verwendbarkeit von Eizellen, die aus Schlachthofmaterial gewonnen wurden. Die Versuche haben aber gezeigt, daß die Wahrscheinlichkeit, solche Eizellen weiter verwerten zu können, klein ist und daß nur unter optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur, Medium usw. Aussichten hierfür bestehen.

V. VERSUCHE MIT KANINCHEN

Da es nicht gelungen ist, bei den aus Schlachthofmaterial gewonnenen Eizellen von Kühen irgendein Kriterium zu finden für die Lebens- und Befruchtungsfähigkeit, wurden zu Vergleichszwecken Untersuchungen an Kaninchen durchgeführt. Gleichzeitig gestatteten diese Experimente, praktische Erfahrungen zu sammeln über die Auslösung der Ovulation, die technische Durchführung der Eigewinnung am toten und lebenden Kaninchen und über die Transplantation von Eizellen.

Versuch No. 1

Kan. No. 7, 3250 g,

Paarung mit einem vasktomierten Bock. 24 Stunden später Laparatomie in Thiogenalnarkose (200 mg als 10%ige Lösung i. p.). Die Narkose war ungenügend und mußte durch Aether-Inhalation ergänzt werden. Die Dosis wurde in den folgenden Versuchen erhöht auf 95 mg/kg Körpergewicht, als 5%ige Lösung intraperitoneal injiziert. Dadurch konnte eine tiefe, etwa 2 Stunden dauernde Narkose erzielt werden.

Das chirurgische Vorgehen gestaltete sich entsprechend der Beschreibung auf Seite 35.

Das Einführen eines Hamkatheters (1 mm Ø) durch den Eileitertrichter bereitete erhebliche, technische Schwierigkeiten. Die Spülflüssigkeit ergoß sich z. T. in die Serosenduplikatur der Mesosalpinx, z. T. floß sie in die Bauchhöhle. Um stärkere Alterationen am Eileiter zu vermeiden, wurden Ovar, Eileiter und Uterushorn herausgeschnitten und anschließend durchgespült. Der Eierstock wies zahlreiche, miliare bis kleinstechnadelkopfgroße Follikel, jedoch keine Ovulationsstellen oder Corpora lutea auf. In der Spülflüssigkeit konnten keine Eizellen gefunden werden. Die Operationswunde heilte per primam ab.

Versuch No. 2

Kan. No. 3, 3200 g,

Bei der Adspektion des Ovars konnten keine Ovulationsstellen gesehen werden. Trotzdem wurde die Gelegenheit benutzt, um das Durchspülen des Eileiters in situ zu versuchen. Die Fixierung des in den Eileitertrichter eingeführten Hamkatheters war schwierig. Der Eileiter füllte sich jedoch gut und die Spülflüssigkeit floß auch gut ab durch eine in das Uterushorn eingeführte Glaskanüle. Die Untersuchung des Sedimentes verlief erwartungsgemäß negativ.

Versuch No. 3

Kan. No. 4, 3300 g

Da in den ersten beiden Versuchen die Ovulation ausgeblieben war, wurde die Häsin an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gedeckt; und zwar je mit einem fertilen und einem vasktomierten Bock. Nach der Laparatomie wurden die Eileiter exzidiert und anschließend mit steriler, körperwarmer Tyrodelösung durchgespült. Jedes Ovar wies 5 frische Corpora lutea auf. In der Spülflüssigkeit jedes Eileiters konnten vier Eizellen isoliert werden. Die Eier des rechten Ovars befanden sich alle im Stadium der Morula und besaßen schätzungsweise 32 Blastomeren. Die Eizellen des linken Ovars wiesen außer 1 bis 2 Polzellen keine Blastomeren auf. Das Morulastadium der Eizellen und die außerordentliche Dicke der Albuminschicht gestattete den Schluß, daß die Ovulation durch die erste Kopulation provoziert worden war.

Bei den ungeteilten Oozyten traten bald degenerative Fragmentationserscheinungen auf, die sich vorwiegend auf die eine Hälfte des Zellkernes erstreckten.

Auch bei den Eizellen des Kaninchens gelang es nicht, im mikroskopischen Bild irgendwelche Anzeichen zu finden, ob diese Zellen noch lebten.

Versuch No. 4

Kan. No. 6, 3300 g,

Paarung mit fertilem Bock. 24 Stunden später Operation. Da im Bereich des Ligamentum ovarii eine starke Blutung auftrat, wurde der Eileiter herausgeschnitten und anschließend durchgespült. Beide Ovarien wiesen 8-10 Follikel verschiedener Größe, aber keine Ovulationsstellen auf. Spülung der Eileiter dementsprechend negativ.

Diskussion

Nachdem von vier gepaarten Kaninchen ein einziges ovuliert hatte, stellt sich die Frage nach der Ursache des Ausbleibens der Ovulation. Zwei Gründe dürften zur Hauptsache dafür verantwortlich sein:

1. Die Kaninchen waren alle noch sehr jung (4-7 Monate). Sie duldeten die Kopulation nur ungern und es war schwierig zu beurteilen, ob dem Bock die Immissio penis einwandfrei gelang.
2. Die Versuche wurden im Januar durchgeführt. Zu einer Zeit also, in der die Bereitschaft zu geschlechtlicher Stimulation ohnehin gering ist.

Im übrigen berichtet auch Pincus (153) über Fälle, wo nach der Kopulation der Follikelsprung unterblieb.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit vermittelt einen Überblick über den heutigen Stand der Eizelltransplantation. Wesen, Bedeutung und Probleme der Übertragung von Eizellen werden skizziert. Auf Grund der Literatur erfolgt eine Zusammenstellung und Diskussion der bisherigen Erfahrungen, woraus sich im wesentlichen folgende Punkte ergeben:

1. Die Übertragung von Eizellen und ihre Weiterentwicklung wurde bisher erfolgreich durchgeführt bei Maus, Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf, Ziege und Rind.
2. Damit sich eine transplantierte Eizelle weiter entwickelt, ist es notwendig, daß der Sexualzyklus des Empfängertieres mit dem des Spendertieres übereinstimmt. Mittel und Wege zur Gleichschaltung des Geschlechtszyklus werden beschrieben.
3. Es ist bei den Haustieren und bei den Labortieren möglich, die Ovulation zeitlich und quantitativ zu beeinflussen. Durch geeignete Behandlung kann der Ovulationstermin willkürlich festgesetzt und die Zahl der ovulierenden Follikel beträchtlich erhöht werden.
4. Die Gewinnung von unbeschädigten Eizellen am lebenden Tier ist gegenwärtig nur durch einen chirurgischen Eingriff möglich. Versuche zur unblutigen Eigewinnung sind mit unbefriedigendem Ergebnis durchgeführt worden.
5. Die Beurteilung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit von Eizellen ist deshalb schwierig, weil unbefruchtete Eizellen eine große Bereitschaft zeigen zu parthenogenetischer Teilung und degenerativer Fragmentation.
6. Unbefruchtete Eizellen, die in vivo nach 6-10 Stunden die Befruchtungsfähigkeit verlieren, können in vitro bei 10° C bis zu 72 Stunden erfolgreich aufbewahrt werden.
7. Befruchtete Eizellen des Kaninchens können bis zu 6 Tagen aufbewahrt werden, ohne daß sie die Fähigkeit zur weiteren Entwicklung ganz verlieren.
8. Folgende Probleme bedürfen noch einer eingehenderen Untersuchung:
 - Wiederholte Superovulation über längere Zeit.
 - Entwicklung unblutiger Methoden zur Gewinnung und Übertragung von Eizellen.
 - Ermittlung der optimalen Milieubedingungen für Eizellen.
 - Prüfung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit von Eizellen.

Eigene Untersuchungen befassen sich mit dem Studium von Eizellen, die aus Geschlechtsorganen geschlachteter Rinder isoliert wurden. Die Technik der Gewinnung von Eizellen und Versuche zum Nachweis ihrer Vitalität und Befruchtungsfähigkeit werden beschrieben. An 41 Eizellen wurden folgende Resultate ermittelt:

1. Bei der Untersuchung von Eizellen im Phasenkontrastmikroskop konnten keine Lebensäußerungen wahrgenommen werden.
2. Versuche, Eizellen durch verschiedene Temperatureinflüsse zu aktivieren und zu einer parthenogenetischen Furchung zu veranlassen, haben fehlgeschlagen.
3. Bullensperma, das den Eizellen schon am Schlachthof durch intrauterine Insemination oder im Labor auf einem Objektträger zugefügt wurde, vermochte weder Befruchtung noch Aktivierung auszulösen.
4. Eizellen, die bei der ersten Untersuchung zwei "Blastomeren" aufwiesen, teilten sich nicht weiter. Es konnte nicht abgeklärt werden, ob es sich um echte Blastomeren befruchteter Eizellen oder um parthenogenetische Furchungsstadien gehandelt hat.
5. Zu Vergleichszwecken wurden auch beim Kaninchen Eizellen isoliert und untersucht. Die Resultate bei der Eigewinnung waren unbefriedigend. Von 4 gepaarten Tieren hatte nur eines ovuliert.

L I T E R A T U R

1. Adams, C.E.(1952): Some aspects of ovulation, recovery and transplantation of ova in the immature rabbit.
Paper in the Ciba Foundation Symposium on Mammalian Germ Cells.(Lond.), 1952; 198-212.
2. Adams, C.E.(1954): The experimental shortening of the generation interval. Brit. Soc. Anim. Prod. 1954; 97-108.
3. Adams, C.E.(1956): Egg transfer and fertility in the rabbit.
Pap. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. (Cambr.)1956; Sect. III; 5 - 6.
4. Anderson, D.H.(1927): The rate of passage of the mammalian ovum through various portions of the Fallopian tube.
Am. J. Physiol. 82; 557.
5. Anderson, J.(1938): Ovulation in the ewe.
J. Agri. Sci. 28; 64-71.
6. Anttila, M.(1954): Transplantation of fertilized ova.
Finsk Vet Tidskr. 60; 220 - 225.
7. Asdell, S.A.(1952): The effect of controlled ovulation upon the fertility of the bovine egg.
Paper in Ciba Foundation Symposium on Mammalian Germ Cells. Lond. 1952; 170-174.
8. Asdell, S.A.(1955): Cattle fertility and sterility.
J. u. A. Churchill Ltd., Lond. 1955.
9. Austin, C.R. u. Smiles, J.(1948): Phase-contrast microscopy in the study of fertilization and early development of the rat egg.
J. Roy. Microscop. Soc. 68; 13-19.
10. Austin, C.R.(1949): Fertilization and the transport of gametes in the pseudopregnant rabbit.
J. Endocrinol. 6; 63 - 70.
11. Austin, C.R.(1949): The fragmentation of eggs following induced ovulation in immature rats.
J. Endocrinol. 6; 104-110.

12. Austin, C.R.(1950): The fecundity of the immature rat following induced superovulation.
J. Endocrinol. 6; 293 - 301.
13. Austin, C.R.(1951): The formation, growth and conjugation of the pronuclei in the rat egg.
J. Microscop. Soc. 71; 295-306.
14. Austin, C.R.(1951): Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg.
Aust. J. Sci. Res. Series B, 4; 581.
15. Austin, C.R. u. Braden, A. W. H.(1953): The distribution of nucleic acids in rat eggs in fertilization and early segmentation.
I. Studies on living eggs by ultraviolet microscopy.
Aust. J. biol. Sci. 6; 324.
16. Austin, C.R. u. Braden, A. H. W.(1954): Induction and inhibition of the second polar division in the rat egg and subsequent fertilization.
Aust. J. Biol. Sci. 7; 195-210.
17. Austin, C.R. u. Braden, A. H. W.(1954): Nucleus formation and cleavage induced in unfertilized rat eggs.
Nature (Lond.), 173; 999.
18. Austin, C.R.(1956): Activation of eggs by hypothermia in rats and hamsters.
J. Exp. Biol. 33; 338 - 346.
19. Averill, R. L. W., Adams, C. E. u. Rowson, L. E. A.(1955): Transfer of mammalian ova between species.
Nature 176; 167 - 169.
20. Averill, R. L. W.(1956): The transfer and storage of sheep ova.
Pap. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. (Camb.),
Sect. III; 7-9.
21. Avis, F. R. u. Sawin, P. B.(1951): A surgical technique for the reciprocal transplantation of fertilized eggs in the rabbit.
J. Heredity 42; 259 - 260.
22. Beatty, R. A. u. Fischberg, M.(1949): Spontaneous and induced triploidy in pre-implantation mouse eggs.
Nature 163; 807 - 808.
23. Beatty, R. A.(1951): Transplantation of mouse eggs.
Nature 168; 995.

24. Biedl, A., Peters, H. u. Hofstätter (1922): Experimentelle Studien über die Einnistung und Weiterentwicklung des Eies im Uterus.
Ztschr. Geburtshilfe u. Gynäkol. 84; 59 - 130.
25. Black, W.G., Otto, G. u. Casida, L.E. (1951): Embryonic mortality in pregnancies induced in rabbits of different reproductive stages.
Endocrinology 49; 237 - 243.
26. Black, W.G., Simon, J., McNutt, S.H. u. Casida, L.E. (1953): Bactericidal activity of the uterus in different endocrine states.
J. Dairy Sci. 36; 586 - 587.
27. Black, W.G., Ulberg, L.C., Christian, R.E. u. Casida, L.E. (1953): Ovulation and fertilization in the hormone-stimulated calf.
J. Dairy Sci. 36; 274 - 280.
28. Boell, E.J. u. Nicholas, J.S. (1948): Respiratory metabolism of the mammalian egg.
J. Exp. Zool. 109; 267 - 281.
29. Bonadonna, T. (1952): Ovulazione multipla o superovulazione. Trapianto delle uova fecondate nelle bovine.
Progr. Vet. (Torino) 1953; 40 pp.
30. Boot, L.M. u. Mühlbock, O. (1953): Transplantation of ova in mice.
Acta physiol. pharmacol. neerl. 3; 133 - 136.
31. Boyarsky, L.H., Baylies, H., Casida, L.E. u. Meyer, R.K. (1947): Influence of progesterone upon the fertility of gonadotrophin-treated female rabbits.
Endocrinology 41; 312 - 321.
32. Braden, A.W.H. (1952): Properties of the membranes of rat and rabbit eggs.
Aust. J. Sci. Res. Ser. 5; 460.
33. Briones, H. u. Beatty, R.A. (1954): Interspecific transfers of rodent eggs.
J. Exp. Zool. 125; 99 - 118.
34. Brock, H. u. Rowson, L.E. (1952): The production of viable bovine ova.
J. Agr. Sci. 42; 479 - 482.
35. Burkl, W. u. Kellner, G. (1956): Wachstum und Reifung der Eizellen in einer Organkultur von Ovarien.
Anat. Anz. Bd. 103, 17/20; 350 - 355.

36. Cameron, H. S. (1942): Clinical observations on the use of equine gonadotropin in the mare and cow.
J. Amer. Vet. Med. Assoc. 100; 60-62.
37. Canivenc, R. u. Mayer, G. (1954): Artificial production of oestrus and mating in the pregnant rabbit.
S. R. Soc. Biol. Paris 148; 100 - 102.
38. Canivenc, R. u. Laffargue (1956): Survie prolongé d'oeufs fécondés non implantés, dans l'utérus de rattes castrées et injectées de progestérone.
C. Rend. Acad. Sc. 242 (24); 2857 - 2860.
39. Casida, L. E. (1935): (zit. n. Adams 1).
Anat. Record 61; 389.
40. Casida, L. E. (1938): The preparation, properties and use of gonad-stimulating hormones.
J. Dairy Sci. 21; 101 - 108.
41. Casida, L. E., Nalbandov, A., Mc Shan, W. H., Meyer, R. K. u. Wisnicky, W. (1940): zit. n. Rowson (161).
Proc. Amer. Soc. Anim. Prod. 33; 302.
42. Casida, L. E., Meyer, R. K., Mc Shan, W. H. u. Wisnicky, W. (1943): Effects of pituitary gonadotrophins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle.
Amer. J. Vet. Research 4; 76 - 94.
43. Casida, L. E., Warwick, E. J. u. Meyer, R. K. (1944): Survival of multiple pregnancies induced in the following treatment with pituitary gonadotrophins.
J. Animal Sci. 3; 22 - 28.
44. Casida, L. E. (1946): Induction of ovulation and subsequent fertility in domestic animals. The problem of fertility.
Ed. by E. T. Engle, Princeton University Press.
zit. n. Chang (59).
45. Casida, L. E. (1953): Some factors, affecting fertilization and embryonic death.
Pap. Ciba Foundation Symposium on Mammalian Germ Cells. Little, Brown u. Co., Boston. 262-268.
46. Champy, C. (1927): Parthénogénèse expérimentale chez le lapin.
C. R. Soc. Biol. 96; 1108.

47. Chang, M. C. (1947): Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days.
Nature. 159; 602 - 603.
48. Chang, M. C. (1948): Probability of normal development after transplantation of fertilized rabbit ova stored at different temperatures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68; 680 - 683.
49. Chang, M. C. (1948): The effects of low temperature on fertilized rabbit ova in vitro, and the normal development of ova kept at low temperature for several days.
J. Gen. Physiol. 31; 385 - 410.
50. Chang, M. C. (1948): Transplantation of fertilized rabbit ova: The effect on viability of age, in vitro storage period, and storage temperature.
Nature (Lond.) 161; 978 - 979.
51. Chang, M. C. (1949): Effects of heterologous sera on fertilized rabbit ova.
J. Gen. Physiol. 32; 291 - 300.
52. Chang, M. C. (1950): Transplantation of rabbit blastocysts at late stage; probability of normal development and viability at low temperature.
Science. 111; 544 - 545.
53. Chang, M. C. (1950): The effect of seminal plasma on fertilized rabbit ova.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.). 36; 188 - 191.
54. Chang, M. C. (1950): Development and fate of transferred rabbit ova or blastocysts in relation to the ovulation time of recipients.
J. Exp. Zool. 114; 197 - 226.
55. Chang, M. C. (1950): Der gegen wärtige Stand der Säugetier-Eitransplantation. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 37; 913.
56. Chang, M. C. (1950): Further study of the role of hyaluronidase in the fertilization of rabbit ova in vivo.
Science. 112; 118.
57. Chang, M. C. (1950): Fertility and sterility as revealed in the study of fertilization and development of the rabbit eggs.
Fertility and Sterility (zit. n. Chang 59).

58. Chang, M. C. (1950): Maintenance of pregnancy in intact rabbits in the absence of corpora lutea.
Endocrinology 1950 (zit. n. Chang 59).
59. Chang, M. C. (1951): The problems of superovulation and egg transfer in cattle.
Proc. 1st Nat. Egg Transf. Breed. Conf. (San Antonio, Tex.) 1949. Ed. by Foundation of Applied Research. San Ant. Tex. 1951; 39 - 46.
60. Chang, M. C. (1951): Transplantation of ova in mammals.
Arch. vet. Pract. 1; No. 2; 1 - 6.
61. Chang, M. C. (1951): Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes.
Nature. 168; 697.
62. Chang, M. C. u. Pincus, G. (1951): Physiology of fertilization in mammals.
Physiol. Revs. 3; 1 - 26.
63. Chang, M. C. (1952): Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on the subsequent fertilization and activation in vivo.
J. Exp. Zool. 121; 351 - 382.
64. Chang, M. C. (1952): Effects of delayed fertilization on segmenting ova, blastocysts and fetuses in rabbits.
Fed. Proc. 11; 24.
65. Chang, M. C. (1952): Development of bovine blastocyst with a note on implantation.
Anat. Rec. 113, No. 2; 143 - 162.
66. Chang, M. C. (1953): Storage of unfertilized rabbit ova: subsequent fertilization and the probability of normal development.
Nature (Lond.), 172; 353 - 354.
67. Chang, M. C. (1953): Fertilizability of rabbit germ cells.
Pap. in Ciba Foundation Symposium on Mammalian Germ Cells. Little, Brown u. Co., Boston, 226-239.
68. Chang, M. C. (1954): Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova.
J. Exp. Zool. 125; 127 - 150.

69. Chang, M. C. (1955): Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit.
Science. 121; 867 - 869.
70. Cole, H. H. (1936): zit. n. Adams (1).
Amer. J. Anat. 59; 299.
71. Cole, H. H. (1937): zit. n. Dowling (77).
Amer. J. Physiol. 119; 704.
72. Cole, H. H., Hart, G. H. u. Miller, R. F. (1945): zit. n. Robinson (159).
Endocrinology 36; 370.
73. Dautzier, L., Thibault, C. u. Wintenberger, S. (1954): La fécondation in vitro de l'oeuf de la lapine.
C.R. Acad. Sci. (Paris), 238; 844 - 845.
74. Day, F. T. (1939): Ovulation and the descent of the ovum in the Fallopian Tube of mare after treatment with gonadotrophic hormone.
J. Agri. Sci. 29; 459 - 469.
75. Deanesly, R. (1939): zit. n. Emmens (84).
J. Endocrinol. 1; 307.
76. Donker, I. D. (1952): Superovulation and transplantation of fertilized ova in bovine.
Diss. Abstr. 12; 323 - 324.
77. Dowling, D. F. (1949): Problems of the transplantation of fertilized ova.
J. Agri. Sci. 39; 374 - 396.
78. Dowling, D. F. (1954): The induction of ovulation in cattle.
Aust. Vet. J. 30; 240 - 244.
79. Dracy, A. E. u. Petersen, W. E. (1949): Recovery on the fertilized ovum from the living cow.
J. Dairy Sci. 32; 726.
80. Dracy, A. E. u. Petersen, W. E. (1950): Isolation of ova from the living bovine.
J. Dairy Sci. 33; 797 - 802.
81. Dracy, A. E. u. Petersen, W. E. (1951): Technique for isolating fertilized bovine ova by flushing the uterus with physiological solutions. Proc. 1st Nat. Egg. Transf. Breed. Conf. Foundation of Applied Research. San Antonio Texas, 1951; 13 - 17.

82. Dracy, A.E.(1953): The future of ova transfer.
Iowa St. Coll.J. Sci. 28; 101 - 105.
83. Dziuk, P.J. u. Petersen, W.E.(1954): Attempts at nonsurgical transfer
ob beovine ova.
J. Anim. Sci. 13; 1019.
84. Emmens, C.W.(1940): The production of ovulation in the rabbit by the
intravenous injection of salts of copper and cadmium.
J. Endocrinol. 2; 63.
85. Engle, E.T.(1927): zit. n. Dowling (77).
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 25; 84.
86. Evans, H.M. u. Simpson, M.E.(1940): Experimental superfecundity
with pituitary gonadotrophins.
Endocrinology 27; 305 - 308.
87. Everett, J.W., Sawyer, C.H. u. Markee, J.E.(1949): zit. n. Asdell
(7). Endocrinology 44; 234.
88. Fekete, E. u. Little, C.C.(1942): Observations on the mammary tumor
incidence of mice born from transferred ova.
Cancer Research 2; 525 - 530.
89. Fekete, E.(1947): Differences in the effect of uterine environment
upon development in the DBA and C 57 black
strains of mice.
Anat. Record 98; 409 - 415.
90. Folley, S.J. u. Malpress, F.H.(1944): The response of the bovine ovary
to pregnant mares' serum and horse pituitary extract.
Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 132; 164 - 188.
91. Folley, S.J., Greenbaum, A.L. u. Roy, A. (1949): The response of the
ovary of the anoestrous goat to pregnant mares'
serum gonadotrophin.
J. Endocrinol. 6; 121 - 131.
92. Fridhandler, L., Hafez, E.F. u. Pincus, G.(1956): O₂-Uptake of
rabbit ova.
III. Intern. Congr. Animal Reprod. I; 48 - 50.
93. Fuller, L.W.(1950): Superovulation in the cow.
Vet. Rec. 62; 291.

94. Gates, A. u. Runner, M. (1952): Factors effecting survival of transplanted ova of the mouse.
Anat. Record 113; 555.
95. Gilchrist, F. u. Pincus, G. (1932): Living rat eggs.
Anat. Record 54; 275.
96. Grant, R. (1934): zit. n. Robinson (159).
Trans. Roy. Soc. Edinb. 58; 1.
97. Hadek, R. (1953) : Observations in ova recovered from the oviduct and uterus of sheep.
J. Anat. Lond. 87; 435:
98. Hamilton, W.J. u. Laing, J. A. (1946): Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation.
J. Anat. (Lond.) 80; 194 - 204.
99. Hammond, J. (1927): Reproduction in the cow.
Cambridge. (zit. n. Dowling 77).
100. Hammond, J. (1934): The fertilization of rabbit ova in relation to time.
J. Exp. Biol. 11; 140 - 161.
101. Hammond, J. (1944): Induced ovulation and heat in anoestrous sheep.
J. Endocrinol. 4; 169 - 179.
102. Hammond, J. u. Bhattacharya, P. (1944): Control of ovulation in the cow. J. Agri. Sci. 34; 1 - 15.
103. Hammond, J. (1949): Induced twin ovulations and multiple pregnancy in cattle.
J. Agri. Sci. 39; 222 - 225.
104. Hammond, J. (1949): Recovery and culture of tubal mouse ova.
Nature. 163; 28.
105. Hammond, J. (1950): Problems concerning the transplantation of fertilized ova or "artificial pregnancy".
Anales Facultad de Medicina. 35; 810 - 819.
106. Hammond, J. (1951): Survival of mouse ova in vitro; and induced multiple pregnancies in cattle.
Proc. 1st Nat. Egg Transf. Breed. Conf. Found. of Applied Research. San Antonio. (Texas). 22 - 25.
107. Hammond, J. (1955): La fonction tubaire chez les animaux domestiques.
La Fonction Tubaire. Masson. Paris, 1955.

108. Hansel, W. u. Trimberger, G.W. (1951): Atropine blockage of ovulation in the cow and its possible significance.
J. Anim. Sci. 10; 719 - 725.
109. Hansel, W. u. Trimberger, G.W. (1952): The effect of Progesterone on ovulation time in dairy heifers.
J. Dairy Sci. 35; 65 - 70.
110. Heape, W. (1890): Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother.
Proc. Roy. Soc. Lond. 48; 457 - 458.
111. Henriet, L. (1955): La transplantation ovulaire.
Ann. Méd. vét. 99; 343 - 359.
112. Hertz, R. u. Hisaw, F.L. (1934): zit. n. Adams (1).
Amer. J. Physiol. 108; 1.
113. Huhn, J. (1957): Untersuchungen über die degenerativen Veränderungen an Follikel- und Tubeneizellen der Säugetiere. Berliner u. Münchner tierärztl. Wochenschr. 70; 506 - 510.
114. Hunter, G.L. (1954): Attempts to synchronize the occurrence of oestrus in sheep as a preliminary to ovum transplantation.
J. Endocrin. 10; xiii - xiv (Proc.).
115. Hunter, G.L., Adams, C.E. u. Rowson, L.E. (1955): Interbreed ovum transfer in sheep.
J. Agric. Sci. 46; 143 - 149.
116. Kurland, I.I. (1951): Ovulation after equine gonadotropin therapy.
Fertil. Steril. 2; 61 - 69.
117. Kvasnickii, A.V. (1951): Opyt mezporodnoi peresadki jaicekletok.
Sovet. Zootekh. 1; 36 - 42.
Anim. Breed. Abstr. 19; 224 (1951).
118. Labhart, A. (1957): Klinik der innern Sekretion.
Springer-Verlag, Berlin.
119. Laing, J.A. (1945): Observations on the survival time of the spermatozoa in the genital tract of the cow and its relation to fertility.
J. Agric. Sci. 35; 72 - 83.

120. Lammers, H. W. (1954): Zur Frage der Eizellenübertragung. Eizellgewinnung aus dem Eierstock des geschlachteten Rindes. Inaug. Diss. Hannover, pp. 64
121. Lamming, G. E. u. Rowson, L. E. A. (1952): Superovulation and ovum transplantation in cattle. Intern. Congr. Physiol. Pathol. Animal Reprod. Arific. Insem. 1; 144 - 153
122. Lewis, W. H. u. Gregory, P. W. (1929): zit. n. Dowling (77). Science, 69; 226.
123. Lloyd, R. S. (1951): Ovarian changes in immature rabbits by equine gonadotrophin. Anat. Rec. 109; 431 - 445.
124. Lopyrin, A. I., Loginova, N. V. u. Karpov, P. L. (1950): Opyt mežporodnoi peresadki zarodyšei u ovec. Sovet. Zootekh. 8; 50 - 64. Animal Breeding Abstr. 18; 415 - 416 (1950).
125. Lopyrin, A. I., Loginova, N. V. u. Karpov, P. L. (1951): Vlijanie ismeneenyh uslovii embryogeneza na rost i razvitie jagnjat. Sovet. Zootekh. 6; 83 - 95. Animal Breed. Abstr. 20; 153 (1952).
126. Macirone, C. u. Walton, A. (1938): Fecundity of male rabbits as determined by "dummy matings". J. Agri. Sci. 28; 122 - 134.
127. Marden, W. G. R. (1952): The Hormone control of ovulation in the calf. Endocrinology 50; 456 - 461.
128. Marden, W. G. R. u. Chang, M. C. (1952): The aerial transport of mammalian ova for transplantation. Science 115; 705 - 706.
129. Marion, G. B. u. Smith, V. R. (1952): Effect of the administration of unfractionated gonadotrophic pituitary extracts during estrus on time of ovulation in the bovine. J. Dairy Sci. 35; 71 - 75.
130. Marshall, F. A. H., Verney, E. B. u. Vogt, M. (1939): zit. n. Venge (181). J. Physiol. 97; 128.

131. Martin, S.M. u. Fernandez (1949): siehe 166!
132. Mather, W.B.(1950): Induced ovulation in the rabbit.
Univ. Qs. Pap. Dep. Biol. 2, No. 17; 3 - 7.
133. Mc Laren, A. u. Michie, D. (1956): Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine fostermothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs.
J. Exp. Biol. 33; 394 - 416.
134. Moricard, R. u. Bossu, J.(1949): Fertilization of the rabbit ova in vitro.
Bull. Acad. nat. Med. 133; 659 - 662.
135. Moricard, R.(1950): Penetration of the spermatozoon in vitro into the mammalian ovum. Oxydopotential level.
Nature. 165; 763.
136. Moricard, R.(1954): Observation of in vitro fertilization in the rabbit.
Nature (Lond.). 173; 1140.
137. Murphree, R.L., Warwick, E.J., Casida, L.E. u. Mc Shan, W.H. (1947): Influence of reproductive stage upon the fertility of gonadotrophin-treated female rabbits.
Endocrinology, 41; 308 - 311.
138. Murphree, R.L., Black, W.G., Otto, G. u. Casida, L.E. (1951): Effect of site of insemination upon the fertility of gonadotrophin treated rabbits of different reproductive stages. Endocrinology 49; 474.
139. Nicholas, I.S.(1933): Development of transplanted rat eggs.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 30; 111 - 113.
140. Nicholas, J.S.(1938): The development of the rat embryos in a circulating medium.
Anat. Record. 70; 199 - 210.
141. Noyes, R. W.(1952): Fertilization of follicular ova.
Fertility and Sterility. 3; 1 - 12.
142. O'Mary, C.C., Pope, A.L. u. Casida, L.E.(1950): zit. n. Hunter (114).
J. Anim. Sci. 9; 499.
143. Parkes, A.S.(1942): zit. n. Adams (1).
J. Endocrinol. 3; 268.

144. Parkes, A.S.(1944): Prenatal mortality.
Nature. 153; 245.
145. Parkes, A.S. u. Smith, A.U.(1953): Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures.
Proc. Roy. Soc. B, 140; 455 - 470.
146. Pincher, C.(1948): Transplanting mammal's eggs.
Discovery 9; 52 - 53.
147. Pincus, G.(1930): Observations on the living eggs of the rabbit.
Proc. Roy. Soc. B. 107; 132 - 167.
148. Pincus, G. u. Enzmann, E. V. (1934): Can mammalian eggs undergo normal development in vitro?
Proc. Nat. Acad. Sci. 20; 121 - 122.
149. Pincus, G. u. Enzmann, E. V. (1935): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro.
I. The activation of ovarian eggs.
J. Exp. Med. 62; 665.
150. Pincus, G.(1936): The eggs of mammals.
MacMillan Company. N. Y. 1936.
151. Pincus, G. u. Enzmann, E. V. (1936): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. The activation of tubal eggs of the rabbit.
J. Exp. Zool. 73; 195 - 208.
152. Pincus, G.(1939): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV. The development of fertilized and artificially activated eggs.
(✓rabbit), J. Exp. Zool. 82; 85-114.
153. Pincus, G.(1940): Superovulation in rabbits.
Anat. Record 77; 1 - 8.
154. Pincus, G. u. Shapiro, H.(1940): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. VII. Further studies on the activation of rabbit eggs.
Proc. Amer. Phil. Soc. 83; 631 - 646.
155. Pincus, G.(1941): Factors controlling the growth of rabbit blastocysts.
Amer. J. Physiol. 133; 412 - 413.

156. Pincus, G. (1951): Observations on the development of cow ova in vivo and in vitro.
Proc. 1st nat. Egg Transf. Breed Conf. Found.
Applied Research, San Antonio (Tex.) 18 - 21.
157. Robinson, T.J. (1950): The control of fertility in sheep. Part I: Hormonal therapy in the induction of pregnancy in the anoestrous ewe.
J. Agri. Sci. 40; 275 - 307.
158. Robinson, T.J. (1952): Role of progesterone in the mating behaviour of the ewe.
Nature (Lond.) 170; 373.
159. Robinson, T.J. (1954): The production of coincident oestrus and ovulation in the anoestrous ewe with progesterone and pregnant mares' serum.
J. Endocrinol. 10; 117 - 124.
160. Rowson, L.E. u. Dowling, D.F. (1949): An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow.
Vet. Record, 61; 191.
161. Rowson, L.E. (1951): Methods of inducing multiple ovulation in cattle.
J. Endocrinol. 7; 260 - 270.
162. Rowson, L.E., Lamming, G.E. u. Fry, R.M. (1953): The relationship between ovarian hormones and uterine infection.
Vet. Record. 22; 335 - 340.
163. Rowson, L.E. (1956): The low temperature preservation of germinal cells. III. Intern. Congr. Animal Reprod. Plenary Papers
78 - 79.
164. Runner, M.W. (1951): Differentiation of intrinsic and maternal factors governing intrauterine survival of mammalian young.
J. Exp. Zool. 116; 1 - 20.
165. Russell, W.L. (1948): Maternal influence on number of lumbar vertebrae in mice raised from transplanted ovaries.
Genetics, 33; 627 - 628.
166. San Martin, M. u. Fernandez, L. (1949): Viabilidad del ovulo de la coneja. (Viability of the rabbit egg cell).
Rev. Fac. Med. vet. Lima, 4; 16 - 18.

167. Sawyer, C.H., Everett, J.W. u. Markee, J.E.(1950): "Spontaneous" ovulation in the rabbit following combined estrogen-progesterone treatment.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 74; 185 - 186.
168. Serebrjakov, P.N. u. Kraseninikova, A.I.(1951): Opyt mezhporodnoi peresadki oplodotvorennykh jaicekletok u krdikov.
Sovet. Zootekh. 1, 43-49.
Anim. Breed. Abstr. 19; 234 (1951).
169. Simpson, S.A. u. Williams, P.C.(1948): Improved method of getting rats' eggs from the Fallopian tubes.
Nature (Lond.) 161; 237.
170. Smith, A. u. Engle, E.T.(1927): zit. n. Adams (1).
Amer. J. Anat. 40; 159.
171. Smith, A. u. Kleiber, M.(1950): Size and oxygen consumption in fertilized eggs.
J. Cellular Comp. Physiol. 35; 131 - 140.
172. Smith, A.(1952): Behavior of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures.
Nature, 170; 374 - 375.
173. Smith, A.(1953): In vitro experiments with rabbit eggs.
In Mammalian Germ Cells. Ciba Foundation Symposium. I.A. Churchill, Lond. 217-222.
174. Thibault, C. u. Ortavant, R.(1948): L'utilisation du sérum de jument gravide en cuniculture.
C.R. Acad. Agric. Fr. 34; 833 - 836.
175. Thibault, C.(1949): L'oeuf des mammifères. Son développement parthénogénétique.
Ann. des Sc., Nat. Zool. II^e serie. 11; 156.
176. Trimberger, G.W. u. Hansel, W.(1955): Conception rate and ovarian function following estrus control by progesterone injections in dairy cattle.
J. Anim. Sci. 14; 224 - 232.
177. Ulberg, L.C., Christian, R.E. u. Casida, L.E.(1951): Ovarian response in heifers to progesterone injections.
J. Animal Sci. 10; 752 - 760.

178. Umbough, R.E.(1949): Superovulation and ovum transfer in cattle.
Amer. J. Vet. Research 10; 295 - 305.
179. Venge, O.(1950): Studies of the maternal influence on the birth weight in rabbits,
Acta Zool. 31; 1 - 148.
180. Venge, O.(1952): A method for continuous chromosome control of growing Rabbits.
Nature, 169; 590 - 592.
181. Venge, O.(1953): Experiments on fertilization of rabbit ova in vitro with subsequent transfer to alien does.
Paper in Ciba Foundation Symposium on mammalian Germ Cells. Little, Brown u. Co. Boston, 1953; 243 - 250.
182. Warwick, B.L., Berry, R.O. u. Horlacher, W.R.(1934): Results of mating rams to angora female goats.
Proc. Amer. Soc. Animal Prod. 225 - 227.
183. Warwick, B.L., Murphree, R.L., Casida, L.E. u. Meyer, R.K. (1943): Maintenance of the pregnancy induced in the female rabbit following treatment with pituitary gonadotrophins.
Anat. Record 87; 279 - 296.
184. Warwick, B.L. u. Berry, R.O.(1949): Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats.
J. Hereditiy 40; 297 - 303.
185. Watermann, A.J.(1933): Development of young rabbit blastocysts in tissue culture and in grafts.
Amer. J. Anat. 53; 317 - 347.
186. Watermann, A.J.(1934): Survival of young rabbit embryos on artificial media.
Proc. Nat. Academy Sci. 20; 145 - 147.
187. Wenner, R.(1952): Grundriß der gynäkologischen Endokrinologie.
Verlag Benno Schwabe u. Co. Basel.
188. Whitney, R. u. Burdick, H.O.(1938): Acceleration of the rate of passage of fertilized ova through the fallopian tubes of rabbits by massive injections of Progynon-B.
Endocrinology 22; 639-642.

189. Whitten, W.K.(1956): Culture of tubal mouse ova.
Nature (Lond.), 177; 96.
190. Willett, E.L., Mc Shan, W.H. u. Meyer, R.K.(1948): Relation of
source of hormone, dosage and stage of cycle to
superovulation in heifers.
J. Animal Sci. 7; 545 - 546.
191. Willett, E.L.(1950): The fertility of heifers following administration
of progesterone to alter the estrual cycle.
J. Dairy Sci. 33; 381 - 382.
192. Willett, E.L., Black, W.G., Casida, L.E., Stone, W.H. u.
Buckner, P.J.(1951): Successful transplantation of a fertilized bovine
ovum.
Science 113; 247.
193. Willett, E.L., Mc Shan, W.H. u. Meyer, R.K.(1952): Relation
of stage of cycle and source of luteinizing hormone
to superovulation in dairy cattle.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79; 396 - 400.
194. Willett, E.L.(1953): Egg transfer and superovulation in farm animals.
Jowa State College Journal of Sci. 28; 83-100.
195. Willett, E.L., Buckner, P.J. and Larson, G.L.(1953): Three
successful transplantations of fertilized bovine eggs.
J. Dairy Sci. 36; 520-523.
196. Wintenberger, S., Dauzier, L. u. Thibault, C.(1953): Develop-
ment in vitro of the ova of sheep and goats.
C.R. Soc. Biol. 147; 1971 - 1974.
197. Winters, L.M., Green, W.W. u. Comstock, R.Z. (1942): Prenatal
development of the bovine.
Univ. Minn. Agri. Exp. Sta. Tech. Bul. 151.
198. Wislocki, G.B. u. Snyder, F.F.(1933): The experimental accelera-
tion of the rate of transport of ova through the
Fallopian tubes.
Bull. Johns Hopkins Hospital 52; 379 - 386.
199. Zavodovskii, M.M., Eskin, I.A. u. Ovsjannikow, G.F.(1935)
Regulirovanie zenskogo polovogo cikla u korov.
Trud. Dinam. Razvit. 9; 75 - 96.
Animal Breed. Abstr. 4; 37 (1936).

200. Ernst, K.(1956): Morphologische und funktionelle Untersuchungen am Rinderovar.
Inaug. Diss. München 1956.
201. Höfliger, H.(1948): Das Ovar des Rindes in den verschiedenen Lebensperioden unter besonderer Berücksichtigung seiner funktionellen Feinstruktur.
Habilitationsschrift, Verlag S. Karger, Basel-New York, 1948.

Es ist mir eine angenehme Pflicht,

Herrn Prof. Dr. W. Baier
zu danken für die Überlassung des Themas und für
die vielseitige und großzügige Hilfe und Förderung,
die er mir und meiner Arbeit zukommen ließ.

Ebenso bin ich

Herrn Privatdozent Dr. W. Leidl
zu großem Dank verpflichtet für seine Ratschläge,
für die Mithilfe bei den Tierversuchen und bei der
Untersuchung und photographischen Aufnahme von
Eizellen.

Darüber hinaus möchte ich an dieser Stelle allen
Assistenten und Mitarbeitern der gynäkologischen
Tierklinik danken für die freundliche Aufnahme,
die ich in diesem Institut gefunden habe.

LEBENS L A U F

Ich wurde am 16. August 1931 als Sohn des Landwirtes Berchtold Gustav und der Lydia, geb. Bolt, geboren. In Uster besuchte ich 6 Jahre die Primar- und drei Jahre die Sekundarschule. Im Frühjahr 1947 trat ich in die Kantonale Oberrealschule Zürich ein, wo ich nach 4 1/2 Jahren die Reifeprüfung ablegte. Im Herbst 1951 immatrikulierte ich mich an der veterinär-medizinischen Fakultät der Universität Zürich. 1954 absolvierte ich die Offiziersschule. Im März 1957 bestand ich mit Erfolg das Staatsexamen. Anschließend war ich als Assistent und Stellvertreter tätig bei folgenden prakt. Tierärzten: Dr. Friedli, Koppingen-BE, Dr. Biedermann, Thalwil-ZH und Dr. Aeppli, Amriswil-TG. Seit Oktober 1957 beschäftigte ich mich hier in München mit der vorliegenden Arbeit.

